

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Martin Reincke

Untersuchungen zur pharmakologischen Blockade des
Chemokinrezeptors CXCR3 im Mausmodell der
Immunkomplex-Glomerulonephritis

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Iris Neumann
aus Bruchsal

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Volker Vielhauer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Wolfgang Neuhofer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 2012

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	7
2 Einführung	9
2.1 Physiologie der Niere	9
2.2 Chronische Niereninsuffizienz	9
2.3 Pathogenese der chronischen Glomerulonephritis	11
2.3.1 Initiationsphase	11
2.3.2 Amplifikationsphase	12
2.3.3 Progressionsphase	13
2.3.4 Terminalphase	13
2.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren	14
2.5 Funktion der Chemokine und Chemokinrezeptoren	17
2.6 Rolle der Chemokine bei Nierenerkrankungen	18
2.7 Therapeutische Optionen der Chemokininhibition	20
2.7.1 Blockade der Chemokinproduktion	21
2.7.2 Neutralisation von Chemokinen durch kompetitive Hemmung mit Chemokinanaloga	21
2.7.3 Elimination CCR-positiver Leukozyten	22
2.7.4 Chemokinrezeptorantagonisten	22
2.8 Der Chemokinrezeptor CXCR3	23
2.9 Der CXCR3-Antagonist AMG487	24
2.10 Fragestellung der Arbeit	25
3 Methoden und Material	27
3.1 Tierexperimentelle Methodik	27
3.1.1 Modell der Nephrotoxischen Serumnephritis	27
3.1.2 Studienprotokoll	28
3.1.3 Versuchstiergruppen	28
3.1.4 Tierhaltung	29
3.1.5 Präimmunisierung	29
3.1.6 Intravenöse Injektion des nephrotoxischen Kaninchenserums	30

3.1.7 Applikation des CXCR3-Antagonisten AMG487	30
3.1.8 Urinentnahme.....	31
3.1.9 Gewinnung von EDTA- Blut und Serum	31
3.1.10 Entnahme und Fixation von Gewebe.....	31
3.2 Durchflusszytometrie (FACS)	32
3.2.1 Nierenzellisolation	32
3.2.2 Antikörperfärbung zur durchflusszytometrischen Charakterisierung und Quantifizierung von Leukozytenpopulationen.....	33
3.2.3 Antikörperfärbung zur durchflusszytometrischen Bestimmung der CXCR3-Oberflächenexpression auf T-Zellen	34
3.2.4 Messung.....	34
3.3 Anti-Kaninchen-IgG-Bestimmung im Serum	35
3.4 Laborchemische Bestimmungen im Serum.....	35
3.5 Histologische Methoden	35
3.5.1 Vorbereitung der Paraffinschnitte	35
3.5.2 PAS-Färbung.....	36
3.5.3 Auswertung der histologischen Präparate.....	36
3.5.4 Immunhistologie.....	37
3.6 Statistische Auswertung	38
3.7 Lösungen und Reagenzien	39
3.7.1 Chemikalien.....	39
3.7.2 Lösungen	40
4 Ergebnisse.....	44
4.1 Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis unter subkutaner Gabe des CXCR3-Antagonisten AMG487.....	44
4.1.1 Nierenfunktion und nephrotisches Syndrom	44
4.1.2 Proteinurie	45
4.1.3 Nachweis autologer anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper.....	46
4.1.4 Glomerulosklerose	47

4.1.5 Durchflusszytometrische Quantifizierung des renalen Leukozyteninfiltrats	48
4.1.6 Immunhistologischer Nachweis des renalen Leukozyteninfiltrats	50
4.1.7 Nachweis von CXCR3-positiven Zellen im Blut und in der Niere	52
4.2 Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis unter oraler Gabe des CXCR3-Antagonisten AMG487	55
4.2.1 Nierenfunktion und nephrotisches Syndrom	55
4.2.2 Proteinurie	57
4.2.3 Nachweis autologer anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper	58
4.2.4 Glomerulosklerose	59
4.2.5 Durchflusszytometrische Quantifizierung des renalen Leukozyteninfiltrats	60
4.2.6 Immunhistologischer Nachweis des renalen Leukozyteninfiltrats	61
4.2.7 Nachweis von CXCR3-positiven Zellen im Blut und in der Niere	64
5 Diskussion	66
5.1 Funktionelle Rolle des Chemokinrezeptors CXCR3 bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis	66
5.2 Pharmakologische Blockade von CXCR3 mit dem kleinmolekularen Antagonisten AMG487 in der Maus	68
5.3 Effekte der subkutanen und oralen CXCR3-Blockade mit AMG487 im Modell der Immunkomplex-Glomerulonephritis	70
5.4 Effekte der subkutanen Vehikelbehandlung mit β -Cyclodextrin im Modell der Immunkomplex-Glomerulonephritis	73
5.5 Effekte der oralen Vehikelbehandlung mit 1%-iger Methylcellulose im Modell der Immunkomplex-Glomerulonephritis	75
5.6 Glomeruläre und interstitielle Effekte der CXCR3 Blockade	76
5.7 Schlussfolgerung der vorliegenden Arbeit	79
6 Abkürzungen und Begriffe	81
7 Literaturverzeichnis	84
8 Anhang	91

8.1 Curriculum vitae	91
8.2 Danksagung.....	93

1 Zusammenfassung

Chemokine gehören zu der Familie der chemotaktischen Zytokine. Eine der wichtigsten Funktionen der Chemokine ist die Regulation der Leukozytenmigration in entzündetes Gewebe und die Aktivierung der Leukozyten. Am Ort der Entzündung werden Chemokine von aktivierten Endothelzellen, aktivierten Thrombozyten und aktivierten subendothelialen Parenchymzellen freigesetzt und von Endothelzellen luminal präsentiert. Es erfolgt die Bindung von Chemokinen an leukozytenständige Chemokinrezeptoren. Dieser Prozess ist die Voraussetzung für die endotheliale Adhäsion und nachfolgende Diapedese der Leukozyten zum Ort der Entzündung. Durch die infiltrierten Leukozyten wird der Entzündungsprozess unterhalten und es kommt bei chronischem Verlauf zur Parenchymzerstörung und Fibrose. Zahlreiche tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass das Chemokinsystem auch bei entzündlichen Nierenerkrankungen eine wichtige proinflammatorische Rolle spielt.

Am Mausmodell einer Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis, der nephrotoxischen Serumnephritis, wurde kürzlich gezeigt, dass das Fehlen des leukozytär exprimierten Chemokinrezeptors CXCR3 die renale Leukozyteninfiltration, Proteinurie und Nierenfunktionsverschlechterung vermindert sowie die glomeruläre Schädigung abschwächt (44, 59).

Wegen der erfolversprechenden Vordaten aus dem Knockout-Mausmodell wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals die Effekte einer pharmakologischen Blockade des Chemokinrezeptors CXCR3 im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis untersucht. Hierfür stand uns ein kleinmolekularer Nichtpeptid-Antagonist (AMG487) mit biologischer Aktivität in der Maus zur Verfügung.

Durch die Blockade des Chemokinrezeptors CXCR3 mit dem Chemokinrezeptorantagonisten AMG487 konnte, im Vergleich zu den nephritischen Kontrolltieren, das Ausmaß der Glomerulosklerose verringert und eine Verbesserung der Nierenfunktion und Proteinurie sowie eine verminderte renale Leukozyteninfiltration erreicht werden. Jedoch ergab sich im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren kein zusätzlicher Effekt durch die Gabe des CXCR3-Antagonisten AMG487. Somit muss man von einer immunmodulatorischen Wirkung des Vehikels an sich ausgehen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine zweite Studie mit einem anderen Vehikel und oraler Gabe des CXCR3-

Antagonisten durchgeführt. In dieser zeigte die CXCR3 Blockade ebenfalls keine signifikanten pharmakologischen Effekte des Antagonisten auf den Krankheitsverlauf im Vergleich zur Vehikelgruppe. Zusammenfassend ist für den CXCR3-Antagonisten AMG487 eine andere Galenik notwendig, um den Benefit im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis erreichen zu können.

2 Einführung

2.1 Physiologie der Niere

Die Niere ist eines der wichtigsten Ausscheidungsorgane des Körpers. Sie befreit den menschlichen Organismus von schädlichen Substanzen. Darüber hinaus kontrolliert sie das Volumen und die Elektrolytzusammensetzung des Extrazellularraums. Auch ist sie für die Blutdruckregulierung und die Wasser- und Kochsalzausscheidung verantwortlich. Zudem reguliert die Niere den Säure-Basen Haushalt des menschlichen Körpers. Außerdem bildet sie kreislaufaktive Hormone wie das Angiotensin-aktivierende Renin. Durch die Bildung von Kalzitriol trägt die Niere zur Mineralisierung des Knochens bei. Auch bei der Erythropoese spielt sie durch die Produktion von Erythropoetin eine entscheidende Rolle (19).

2.2 Chronische Niereninsuffizienz

Die Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz betrug in Deutschland im Jahre 2006 808 pro einer Million Einwohner (Abb. 2.1). Das sind 4,9% mehr als im Vorjahr (1). Auch die Inzidenz ist steigend: im Jahre 2006 wurden in Deutschland 213 Neuerkrankungen pro einer Million Einwohner gemeldet, was eine Steigerung von 4,6% zum Vorjahr bedeutet (1). Diabetes und chronische Glomerulonephritiden sind die zwei häufigsten Ursachen für die Entstehung einer terminalen Niereninsuffizienz (vgl. Abb. 2.2). 2004 betrugen die Kosten in den USA für die chronische Niereninsuffizienz 18.5 Billionen US Dollar. Davon wurden allein für Dialysebehandlungen 16.3 Billionen US Dollar ausgegeben (18).

Aus diesen epidemiologischen Daten wird deutlich, dass die Niereninsuffizienz nicht nur eine für den einzelnen betroffenen Patienten schwere Lebensbelastung, sondern auch für die Gesellschaft, bzw. das Gesundheitssystem eine große finanzielle Belastung ist.

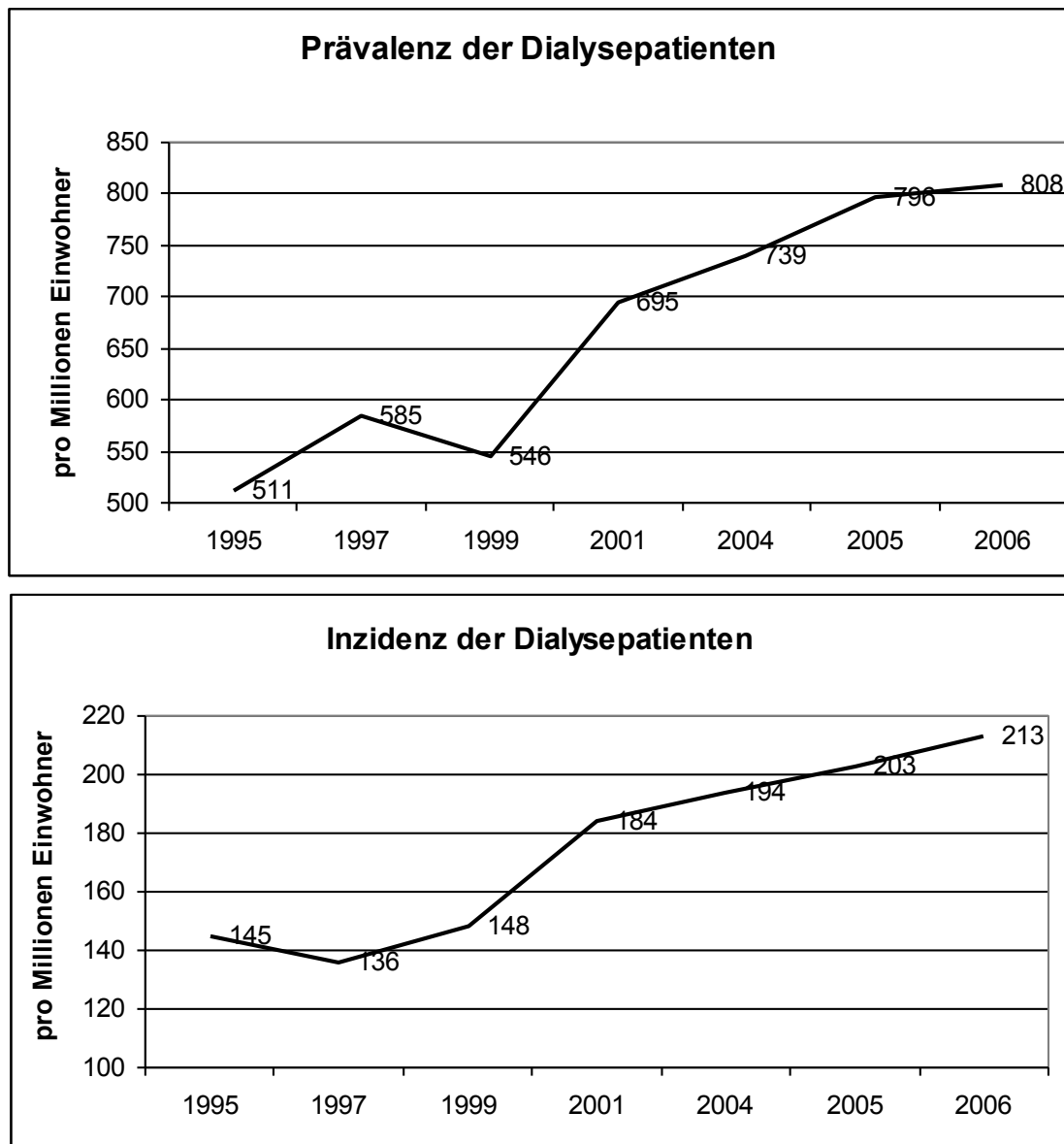


Abb. 2.1: Prävalenz und Inzidenz der chronischen Niereninsuffizienz (adaptiert nach Ref. 1).

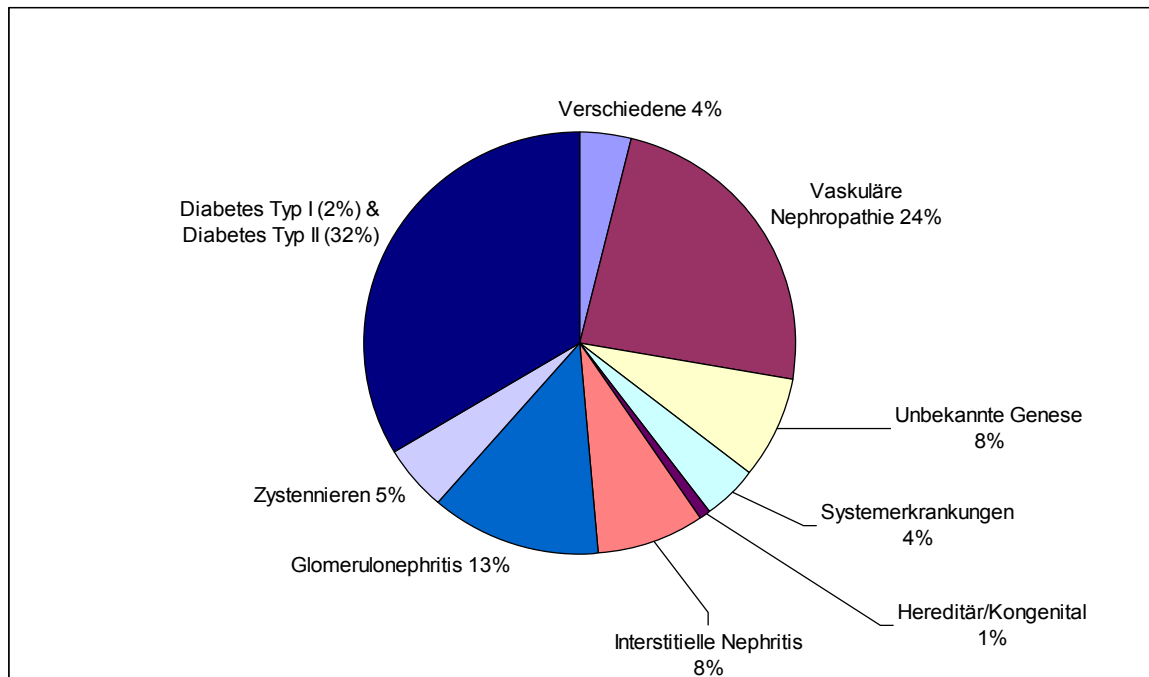


Abb. 2.2: Diagnoseverteilung erfasster lebender dialysepflichtiger Patienten in Deutschland 2006 (adaptiert nach Ref.1).

2.3 Pathogenese der chronischen Glomerulonephritis

Wie oben bereits erwähnt, gehört die Glomerulonephritis mit zu den häufigsten Ursachen, die zu einer chronischen Niereninsuffizienz mit nachfolgender Dialysepflichtigkeit führen. Die Glomerulonephritis äußert sich in einer Vielzahl von Symptomen wie z.B. Proteinurie, Hämaturie, Ödeme, arterielle Hypertonie und Nierenversagen. Für die auslösenden Faktoren einer Glomerulonephritis kommen viele Ursachen in Betracht. Darunter zählen auch Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran und die glomeruläre Ablagerung präformierter Immunkomplexe.

Manche Glomerulonephritiden haben die Tendenz zur Heilung, andere schreiten sehr rasch voran und manche zeigen eine langsame Progression über Jahre hinweg. Dieser Progressionsprozess wird in folgende vier Phasen unterteilt:

2.3.1 Initiationsphase

Die Schädigung glomerulärer Zellen, z.B. durch lokale Ablagerung von Immunkomplexen führt zur Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren. Diese be-

wirken die Einwanderung und Aktivierung von Leukozyten am Ort der Entzündung. Bei diesem Vorgang spielen neben Zytokinen und Adhäsionsmolekülen Chemokine eine entscheidende Rolle: Chemokine vermitteln die feste Adhäsion von zirkulierenden Leukozyten an glomeruläres Endothel und erleichtern durch kontinuierliche Einflüsse auf die Tight Junctions der Endothelzellen und die Induktion von Metallproteinasen die Extravasation der Leukozyten aus den Blutgefäßen zum Ort der Entzündung. Anschließend können Chemokine direkt eine Leukozytenaktivierung vermitteln. So kommt es zu strukturellen Schäden innerhalb des Glomerulus, die sich klinisch aufgrund der geschädigten Filtrationsbarriere als Proteinurie auswirken. (3,16, 20)

2.3.2 Amplifikationsphase

Im weiteren Verlauf kommt es zu einem positiven Feedbackmechanismus: die infiltrierten Leukozyten sezernieren ihrerseits Chemokine und Zytokine, wodurch ortsständige Leukozyten aktiviert und weitere Leukozyten aus den Blutgefäßen angelockt werden. Infiltrierende Makrophagen sind die Hauptquellen für Sauerstoffradikale, inflammatorische Lipide, Wachstumsfaktoren und profibrotische Zytokine. So kommt es zu einer weiteren Schädigung des Gewebes mit mesangioproliferativer Glomerulonephritis und fokaler Sklerose. Kommt es zu einem erheblichen Schaden der Podozyten, verstärkt sich nicht nur die Proteinurie, sondern durch die fokale Adhäsion der entblößten glomerulären Basalmembran und der Bowmann'schen Kapsel wird der entzündlich fibrotische Umbau gefördert, der zu einer glomerulären Halbmondbildung und schließlich kompletten narbigen Verödung der Glomeruli führen kann.

Bei allen chronischen glomerulären Nephropathien greift der initiale glomeruläre Schaden im Verlauf auf das Interstitium über. Hierfür werden mehrere Mechanismen diskutiert:

1. Durch die Schädigung der Filtrationsbarriere befinden sich proinflammatorische Mediatoren, Wachstumsfaktoren und Albumin im Ultrafiltrat. Diese stimulieren tubuläre Epithelzellen zur Sezernierung proinflammatorischer Mediatoren wie Chemokin und Zytokin.

2. Über die postglomerulären Kapillaren gelangen proinflammatorische Mediatoren bis in die peritubulären Kapillaren. Somit werden interstitielle Zellen und tubuläre Epithelzellen aktiviert.

Diese zwei Mechanismen fördern die Rekrutierung mononukleärer Leukozyten in das Interstitium. So kommt es neben dem glomerulären Schaden zu einer sekundären interstitiellen Nephritis, beginnenden Fibrose und einem voranschreitenden Verlust der Organfunktion (16, 20).

2.3.3 Progressionsphase

Diese Phase ist von der Zunahme des glomerulären und interstitiellen Schadens geprägt:

Durch die kontinuierliche Stimulation renaler Parenchymzellen wird ständig extrazelluläre Matrix gebildet. Diese Matrixausdehnung führt zu Stenosen und Obliterationen einzelner glomerulärer Kapillaren und zur Dilatation anderer.

Im Tubulointerstitium vermitteln die infiltrierten Makrophagen und T-Zellen die kontinuierliche Abgabe profibrotischer Mediatoren. Durch die Akkumulation und Aktivierung der Fibroblasten kommt es zur Erweiterung des interstitiellen Raumes und somit zu einer tubulointerstitiellen Ischämie. So wird die Chemokin- und Zytokinsynthese weiter stimuliert und es kommt zu einem weiteren positiven Feedback-Mechanismus (16, 20).

2.3.4 Terminalphase

Der fortschreitende fibrotische Umbau führt zur ausgeprägten Glomerulosklerose und tubulären Atrophie. Das Nierenparenchym verliert seine strukturelle und funktionelle Integrität: es kommt zur Niereninsuffizienz mit allen klinischen Symptomen und Zeichen der Urämie.

Die Leukozyteninfiltrate lösen sich zwar auf, jedoch fahren die Fibroblasten aufgrund anhaltender Hypoxie und autokriner Stimulation mit der Bildung extrazellulärer Matrix fort. Myofibroblasten führen schließlich über Kontraktion des fibrotischen Gewebes zum makroskopischen Korrelat, der Schrumpfniere (16, 20).

2.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine gehören zur Familie der chemotaktischen Zytokine. Viele verschiedene Zelltypen können Chemokine ausschütten. Ihr Molekulargewicht beträgt 8-12 kD und sie besitzen eine charakteristische Tertiärstruktur mit drei β -gefalteten Blättern und einer C-terminalen α -Helix.

Die Einteilung der Chemokine in Untergruppen erfolgt nach ihrer Struktur. Die meisten Chemokine haben N-terminal vier Cysteine. In der CXC-Familie sind diese zwei Cysteine nahe dem N-Terminus durch eine variable Aminosäure getrennt. Bei der CC-Familie liegen diese beiden Cysteine direkt nebeneinander. Lymphotaktin ist der einzige Vertreter der C-Familie, bei dem ein terminales Cystein fehlt. Auch die CX₃C-Familie hat bisher nur ein Mitglied, Fractalkine. Hier liegen drei variable Aminosäuren zwischen den zwei Cysteinen (vgl. Abb. 2.3).

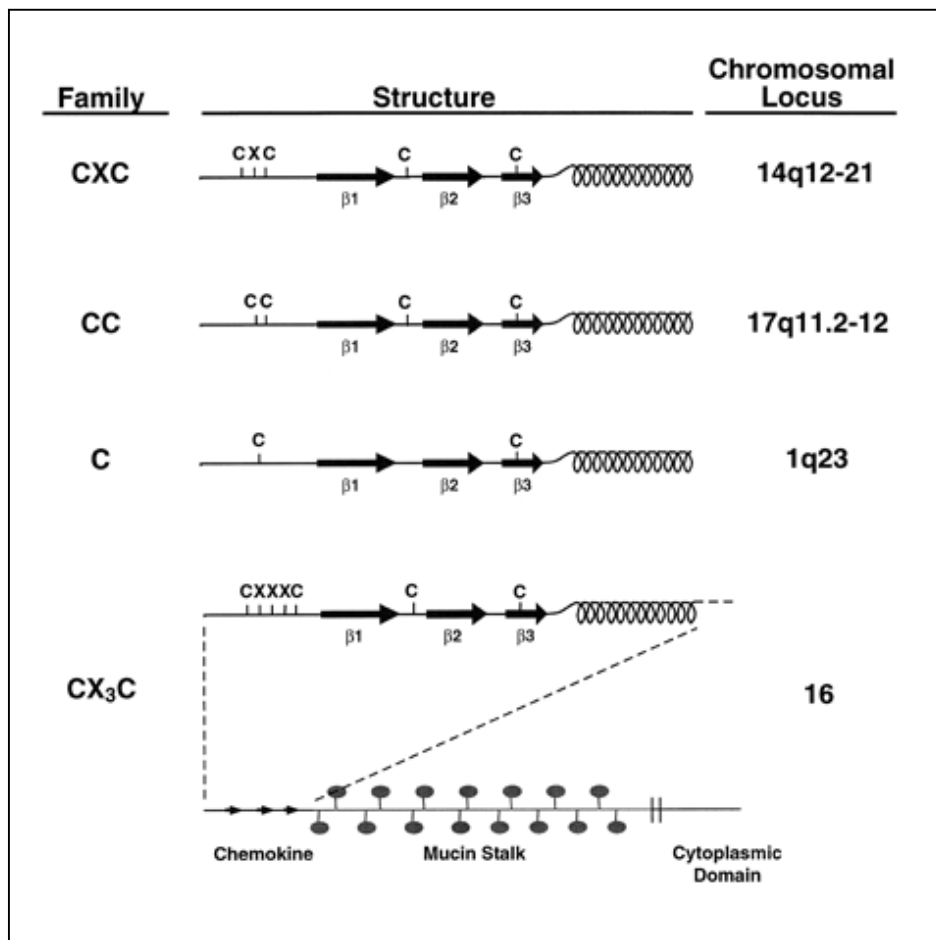


Abb. 2.3: Einteilung der Chemokine (übernommen aus Ref. 2).

Entsprechend dieser strukturellen Einteilung einigte man sich auf eine systematische Nomenklatur, die sich aus der Gruppenzugehörigkeit, gefolgt von einem L für Ligand und einer fortlaufenden Nummerierung zusammensetzt (4, 5, 6; vgl. Tab. 1).

Es existiert noch eine funktionelle Einteilung, die aus zwei Klassen besteht: homeostatische Chemokine und inflammatorische Chemokine. Erstere spielen bei der Leukozytenentwicklung und der „immunologischen Überwachung“ eine funktionelle Rolle. Im Gegensatz dazu werden die inflammatorischen Chemokine von proinflammatorischen Stimuli induziert und manipulieren die angeborene und erworbene Immunantwort.

Tabelle 1: Chemokine und Chemokinrezeptoren (adaptiert nach Ref. 6)

Sytematischer Name	Herkömmlicher Name	Rezeptor
CXCL1	GRO- α , MGSA,(mouse)N51/KC a , (mouse)MIP-2	CXCR2
CXCL2	Gro- β , MIP-2 α	CXCR2
CXCL3	Gro- γ , MIP-2 β	CXCR2
CXCL4	Platelet factor-4	unbekannt
CXCL5	ENA-78	CXCR2
CXCL6	GCP-2	CXCR1
CXCL7	NAP-2	CXCR2
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
CXCL9	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10, (mouse) CRG-2	CXCR3
CXCL11	I-TAC, β -R1, IP9, H174	CXCR3
CXCL12	SDF-1 α , SDF-1 β , PBSF	CXCR4
CXCL13	BCA-1, BLC	CXCR5
CXCL14	Bolekine, BRAK	Unbekannt
CXCL15	Lungkine	Unbekannt
CXCL16	SR-PSOX	Unbekannt
CCL1	I-309, (mouse)TCA-3	CCR8
CCL2	MCP-1, MCAF, (mouse) JE	CCR2
CCL3	MIP-1 α , MIP-1 α S, LD78 α	CCR1, CCR5

CCL4	MIP-1 β	CCR5
CCL5	RANTES	CCR1, CCR5
CCL6	(mouse)C10, (mouse) MRP-1	Unbekannt
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	CCR2, CCR3
CCL9	(mouse) MRP-2, (mouse) MIP-1 γ	Unbekannt
CCL10	Unbekannt	Unbekannt
CCL11	Eotaxin	CCR3
CCL12	(mouse) MCP-5	CCR2
CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3
CCL14	CC-1, HCC-1, NCC-2, CCCK-1/CCCK-3, Ck β 1, MCIF	CCR1, CCR3
CCL15	HCC-2, Leukotactin-1, MIP-5, CC-2, NCC-3, MIP-1 δ	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4, LEC, NCC-4, LMC, monotactin-1 LCC-1, ILINCK	CCR1
CCL17	TARC	CCR4
CCL18	DC-CK-1, PARC, MIP-4, AMAC-1, ck β 7	Unbekannt
CCL19	ELC, MIP-3 β , exodus-3, ck β 11	CCR7, CCR11
CCL20	MIP-3 α , LARC, exodus-1, (mouse) ST38	CCR6
CCL21	SLC, 6CKine, exodus-2, TCA4, ck β 9	CCR7, CCR11
CCL22	MDC, (mouse) dc/ β -ck, (mouse) abcd-1	CCR4
CCL23	MIP-3, MPIF-1, ck β 8-1	CCR1
CCL24	MPIF-2, eotaxin2, ck β 6	CCR3
CCL25	TECK, ck β 15	CCR9, CCR11
CCL26	MIP-4 α , eotaxin3	CCR3
CCL27	CTACK, ESkin, ILC (mouse) ALP, skin-kine	CCR10
CCL28	MEC	CCR10
XCL1	Lymphotactin α , SCM-1 α , ATAC	XCR1
XCL2	Lymphotactin β , SCM-1 β , ATAC	XCR1
CX ₃ CL1	Fractalkine, (mouse) neurotactin	CX ₃ CR1

Chemokinrezeptoren sind membranständige G-Protein-gekoppelte Moleküle mit sieben transmembranen Domänen. Jeder Rezeptor besitzt eine bestimmte Chemokinspezifität. Im Allgemeinen können die inflammatorischen Rezeptoren mehrere Liganden binden, im Gegensatz dazu binden die homeostatischen Rezeptoren meistens nur einen bestimmten Liganden. Auch das auf einem Zelltyp expri-

mierte Rezeptor-Repertoire ist begrenzt: nicht jeder Rezeptor wird auf jeder Zelle exprimiert (4, 5, 6; vgl.Tab.2).

Tabelle 2: Bekannte Chemokinrezeptoren und ihre Liganden auf verschiedenen Zellpopulationen

Rezeptor	Ligand	Zelltypen
CXCR1	IL-8	Neutrophile
CXCR2	IL-8, NAP-2, Gro α , ENA-78	Neutrophile
CXCR3	IP-10, MIG, ITAC	Aktivierte T-Zellen
CXCR4	SDF-1	Naive T-Zellen, B-Zellen
CXCR5	BCA-1	B-Zellen
CCR1	MCP-3, RANTES, MIP-1 α	Aktivierte T-Zellen, Monozyten, Eosinophile, dendritische Zellen
CCR2	MCP-1,-2,-3,-4,-5	Monozyten, Makrophagen, aktivierte T-Zellen
CCR3	Eotaxin, MCP-3, -4, RANTES	Eosinophile, Basophile, aktivierte T-Zellen
CCR4	TARC, MIP-1 α , RANTES, MDC	Aktivierte T-Zellen, Basophile, Thrombozyten
CCR5	MIP-1 β , RANTES, MIP-1 α	Aktivierte T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen
CCR6	MIP-3 α	Dendritische Zellen, T-Zellen
CCR7	MIP-3 β	B-Zellen, T-Zellen, dendritische Zellen
CCR8	I-309	Monozyten, Makrophagen
CCR9	CC-Chemokine	Nicht-hämatopoetische Zellen
CX3CR1	Fractalkine	Natürliche Killerzellen, CD8-positive Zellen

2.5 Funktion der Chemokine und Chemokinrezeptoren

Eine der wichtigsten Funktionen der Chemokine ist die Vermittlung der Leukozytenmigration in entzündetes Gewebe und die Aktivierung der Leukozyten. Die Leukozytenmigration aus dem intravasalen Raum in entzündetes Gewebe ist ein hochregulierter selektiver Prozess, der viele Liganden-Rezeptor-Interaktionen zwischen zirkulierender Leukozyten und Endothelzellen einbezieht:

Durch kurze Interaktion zwischen Selektinen der Endothelzellen und der Selektinliganden auf der Leukozytenoberfläche wird ein reversibles Rollen der Leukozyten an der endothelialen Wand induziert (7, 8). Am Ort der Entzündung werden Chemokine von aktivierten Endothelzellen, aktivierten Thrombozyten und akti-

vierten subendothelialen Parenchymzellen freigesetzt und von Endothelzellen luminal präsentiert. Während der Rollphase der Leukozyten kommen diese in engen Kontakt mit den auf der Endothelzelloberfläche gebundenen Chemokinen, die einen entscheidenden Schritt der Infiltration vermitteln: Nach Bindung von Chemokinen an leukozytenständigen Chemokinrezeptoren werden Integrine auf der Oberfläche der Leukozyten aktiviert, wodurch es zu einer irreversiblen festen Adhäsion der Leukozyten an das Endothel kommt. Diese Haftung ist die Voraussetzung für die anschließende Diapedese und Migration der Leukozyten in das entzündete Gewebe (4, 9,10,11).

Daneben spielen Chemokine eine wichtige Rolle bei der angeborenen und erworbenen Immunantwort. So sind sie mitverantwortlich für die Aktivierung der Leukozyten, für die Funktion dendritischer Zellen, für die Lymphozytenreifung und Differenzierung während der immunologischen Überwachung und Immunantwort. Schließlich sind wichtige Chemokinfunktionen bei der Hämatopoese und Angiogenese beschrieben worden (3, 4, 5, 12-15).

2.6 Rolle der Chemokine bei Nierenerkrankungen

Alle intrinsischen Nierenzellen einschließlich Endothelzellen, Podozyten, Mesangiumzellen und Tubuluszellen können Chemokine produzieren. In vitro Studien haben gezeigt, dass die Chemokinproduktion durch proinflammatorische Stimuli, wie z.B. Sauerstoffradikale, Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ), vasoaktive Substanzen wie Angiotensin II und Lipopolysaccharide, induziert werden kann (4, 17).

Tabelle 3: Chemokinexpression durch renale Zellen

Zellart	CXC-Chemokine	CC-Chemokine
Mesangiumzellen	IL-8, GRO, CINC, IP-10, ENA-78, MIP-2	MCP-1, RANTES, MIP-1 α
Epithelzellen	IL-8, IP-10	MCP-1, RANTES
Endothelzellen	IL-8, IP-10	MCP-1, RANTES
Interstitialzellen	IP-10	MCP-1
Glomeruläre Epithelzellen		MCP-1

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Chemokine primär nur am Ort des initialen renalen Gewebeschadens exprimiert werden. Im Modell einer akuten Immunkomplex-Glomerulonephritis werden Chemokine ausschließlich im Glomerulus produziert (21), im Gegensatz dazu konnte die Expression im Modell der unilateralen Ureterligatur mit ausschließlich interstitieller Nephritis nur im Interstitium nachgewiesen werden (22). Chemokine werden jedoch in beiden renalen Kompartimenten exprimiert, wenn sich durch das Fortschreiten einer glomerulären Erkrankung ein sekundärer tubulointerstitieller Schaden entwickelt, wie z.B. im Modell der murinen Lupusnephritis (23, 24).

Wie unter Punkt 2.3. bereits beschrieben, ist eine veränderte Chemokinexpression an der Initiierung, Progression, jedoch auch an der Resolution renaler Krankheiten beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass beim selbstlimitierten Verlauf einer Pferde-Apoferritin-induzierten Immunkomplex-Glomerulonephritis die gesteigerte renale Expression proinflammatorischer Chemokine wie CCL2/MCP-1 und CCL5/RANTES der maximalen Leukozyteninfiltration und Proteinurie vorausgeht und zum Zeitpunkt der stärksten glomerulären Entzündung bereits wieder auf das Ausgangsniveau abgesunken ist (21). Die Reduzierung der lokalen Chemokinexpression ist hierbei voraussetzend für die Resolution der glomerulären Entzündung. Eine anhaltende, lokal gesteigerte Chemokinproduktion führt im gleichen Modell dagegen zu einer progredienten Nierenschädigung mit fortschreitendem renalen Funktionsverlust. Bei Mäusen mit Pferde-Apoferritin-induzierten Glomerulonephritis stellt die zusätzliche Injektion von CpG-Oligonukleotiden, die viralen Sequenzen gleichen, einen zusätzlichen inflammatorischen Stimulus dar. Dieser führte zu einer verstärkten, anhaltenden renalen Chemokinproduktion und zu einer gesteigerten Infiltration CCR2- und CCR5-positiver Leukozyten. Histologisch wurde eine vermehrte glomeruläre Proliferation, Kapillarthrombose und eine zunehmende Glomerulosklerose beobachtet (25, 26).

Oben genannte und zahlreiche weitere Studien zeigen somit, dass Chemokine und Chemokinrezeptoren neben anderen Faktoren wie Infektionen, Hypoxie, Proteinurie und der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems eine wichtige

Rolle in der Initiierung, Progression und Resolution bei Nierenerkrankungen spielen.

2.7 Therapeutische Optionen der Chemokininhibition

Die momentan zur Verfügung stehenden antiinflammatorischen Medikamente zur Behandlung von progredienten Glomerulonephritiden (Kortikosteroide, Cyclosporin, Cyclophosphamid und andere) wirken systemisch und gehen somit mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen einher, wie z.B. Immunsuppression, Osteoporose, Stammfettsucht, Thromboseneigung und Tumorinduktion. Dies bedeutet für den Patienten eine therapie-assoziierte gesteigerte Morbidität. Gezieltere, potentiell nebenwirkungsärmere antiinflammatorische Therapieansätze werden daher dringend benötigt.

Die Reduzierung leukozytärer Effektorzellen beispielsweise durch selektive Inhibition von Chemokinen könnte eine solche Therapieoption darstellen. Es gibt verschiedene Ansätze, die Migration der Leukozyten aus dem intravasalen Raum und deren Akkumulation am Ort des entzündeten Gewebes durch Blockade des Chemokin/Chemokinrezeptorsystems zu hemmen: Inhibition der lokalen Chemokinproduktion, Chemokinneutralisation, Elimination von CCR-positiven Leukozyten oder Blockieren von Chemokinrezeptoren (Abbildung 2.4).

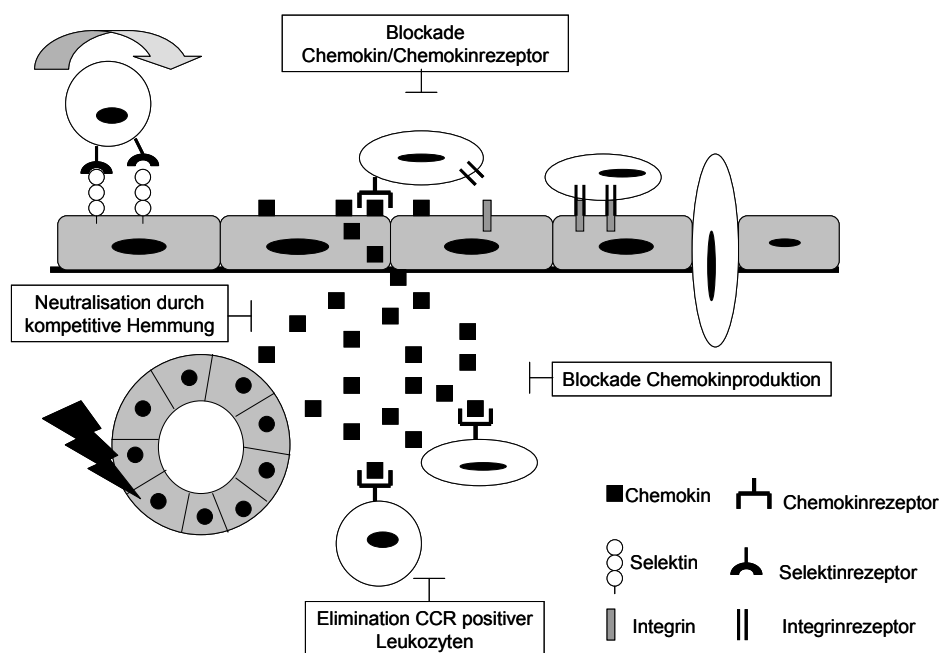


Abb. 2.4: Mechanismus der Transmigration der Leukozyten und mögliche Ansätze für therapeutische Intervention (adaptiert nach Ref. 4).

2.7.1 Blockade der Chemokinproduktion

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist mitverantwortlich für die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine im Rahmen einer akuten Entzündung (30). Die Blockade von NF- κ B durch Glukokortikoide führt zu einer verminderten Freisetzung von Chemokinen (31).

Auch ACE-Hemmer spielen eine wichtige Rolle bei der Reduzierung der Chemokinproduktion. Angiotensin II erhöht die TNF- α Produktion sowie die Expression anderer proinflammatorischer Mediatoren wie IL-6, MCP-1 und NF- κ B (32, 33). Somit besitzen ACE-Hemmer ein antientzündliches Potenzial.

2.7.2 Neutralisation von Chemokinen durch kompetitive Hemmung mit Chemokinanaloga

Eine weitere therapeutische Möglichkeit liegt in der kompetitiven Hemmung der Chemokinwirkung durch blockierende Chemokinanaloga. So wurde z.B. vMIP-II, ein kleines virales chemokinartiges Protein entdeckt, welches vom humanen Herpesvirus 8 produziert wird. Dieses inhibiert im Modell der anti-Basalmembranglomerulonephritis der Ratte die von den Chemokinen MCP-1, MIP1 β , RANTES und Fractalkine induzierte Chemotaxis, reduziert die glomeruläre Leukozyteninfiltration und vermindert die Proteinurie (37). Im Mausmodell der fortgeschrittenen Lupusnephritis konnte durch Expression einer blockierenden MCP-1 Mutante eine verminderte Leukozyteninfiltration erreicht werden (34). Durch Deletion oder Hinzufügen von Aminosäuren an das N-terminale Ende erhalten Chemokine antagonistische Eigenschaften (38). Beispiele hierfür sind die CCL5/RANTES-Antagonisten MET-RANTES (39) und AOP-RANTES (40). So konnte durch AOP-RANTES im Modell der Anti-Thy-1-Nephritis die Monozyten- und Makrophageninfiltration gesenkt werden (41). Mit den CCL5/RANTES-Antagonisten Met-RANTES und AOP-RANTES wurden jedoch in Glomerulonephritismodellen neben einer reduzierten Leukozyteninfiltration auch ausgedehntere glomeruläre Schäden mit einer erhöhten Proteinurie beobachtet (35). Dies weist neben den proinflammatorischen auch auf immunregulatorische Funktionen des Chemokins CCL5/RANTES hin.

2.7.3 Elimination CCR-positiver Leukozyten

Die gezielte Elimination von Immunzellen, die durch ihren Chemokinrezeptor erkannt werden, ist eine mögliche therapeutische Option, vor allem wenn die Leukozyteninfiltration bereits erfolgt ist. Die Depletion, z.B. CCR5-positiver Monozyten, ist prinzipiell durch bispezifische Antikörper möglich, die gleichzeitig CCR5 positive Zielzellen wie auch CD3 T-Zellen binden. Somit wird die T-Zelle aktiviert, die CCR5-positive Zelle zu eliminieren (36).

Eine andere Möglichkeit wird durch ein Fusionsprotein, bestehend aus CCL5/RANTES und einer verkürzten Version des Pseudomonas Exotoxins A ermöglicht. Dieses zerstört spezifisch die Zielzelle, nachdem es an den CCR5-Rezeptor gebunden hat (36).

2.7.4 Chemokinrezeptorantagonisten

Auch die Blockade der Chemokinrezeptoren stellt ein pharmakologisch attraktives Therapiekonzept dar. Sie gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die pharmakologisch durch kleinmolekulare Antagonisten gut blockiert werden können, z.B. die β -adrenergen Rezeptoren durch β -Blocker. Die Blockade eines Chemokinrezeptors hat den Vorteil, dass gleichzeitig mehrere Chemokine, die den entsprechenden Rezeptor aktivieren, gehemmt werden können. Ein Beispiel stellt der kleinmolekulare nichtpeptidische CCR1-Antagonist BX471 (5-chloro-2-(2-[(2R)-4-(4-fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethyl phenyl) ureahydrogen chloride salt) dar. BX471 konnte im Modell der unilateralen Ureterligatur die Akkumulation inflammatorischer Zellen und die renale Fibrose verringern (42). Auch bei schon chronischen Nierenschäden war es möglich, durch BX471 ein Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern und die Nierenfunktion durch selektive Inhibition der interstitiellen Leukozytenrekrutierung und der Fibrose zu verbessern (43). Im Mausmodell der fokal-segmentalen Glomerulosklerose mit nephrotischem Syndrom waren die gleichen positiven Effekte von BX471 zu beobachten (43).

2.8 Der Chemokinrezeptor CXCR3

Der Chemokinrezeptor CXCR3 wurde 1996 erstmals beschrieben. CXCR3 besteht aus 368 Aminosäuren, die wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in der typischen sieben transmembranen α -helikalen Struktur angeordnet sind.

CXCR3 wird hauptsächlich auf aktivierten Th1-Lymphozyten exprimiert, aber er ist auch im Blut auf T-Zellen, in kleinen Mengen auf B-Zellen und natürlichen Killerzellen vorhanden (29). CXCR3 besitzt 3 Hauptliganden: MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) und I-TAC (CXCL11) (29).

Normalerweise binden Chemokine nur Rezeptoren der gleichen Klasse. CXCR3 bildet in dieser Hinsicht eine Ausnahme: CCR3-Agonisten, wie z.B. CCL13 und CCL11, binden mit hoher Affinität an CXCR3 (29).

CXCR3 scheint bei vielen Krankheiten, wie z.B. bei multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Atherosklerose, COPD, entzündlichen Darmkrankheiten und entzündlichen Hautkrankheiten eine funktionelle Rolle zu spielen (29).

Im Modell der Adjuvanz-induzierten Mausperitonitis konnte durch CXCR3-Blockade die Infiltration von Th1-Zellen am Ort der Entzündung verringert werden. Dieses Ergebnis spricht für eine entscheidende Rolle von CXCR3 bei der Vermittlung einer T-Zell-Migration an den Ort der Entzündung (47). Im Mausmodell der Dextran-Sodiumsulfat-induzierten Colitis konnte mit dem Chemokinrezeptorantagonisten TAK-779 eine verminderte Expression von CXCR3 erreicht werden, was mit einer erniedrigten Infiltration von CD4⁺-Zellen in die Mucosa einherging (27). Ebenso war durch Gabe von TAK-779 in der bronchoalveolären Lavage bei Mäusen mit pulmonaler Granulomatose eine reduzierte Zahl CXCR3-positiver und CCR5-positiver CD4-T-Zellen nachweisbar, und es kam zu einer Verbesserung der Granulomatose (53).

CXCR3 scheint auch die renale Entzündung zu vermitteln. Im Mausmodell einer Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis, der nephrotoxischen Serumnephritis konnte bei CXCR3-defizienten Mäusen eine verminderte renale Infiltration von T-Zellen, sowie eine Verbesserung der renalen Funktion, der Albuminurie und der Halbmondbildung festgestellt werden (44, 46).

2.9 Der CXCR3-Antagonist AMG487

AMG487 ist ein kleinmolekularer, nichtpeptidischer, nichtkompetitiver CXCR3-Antagonist, der zur Gruppe der auf (aza)-quinazolinone basierenden CXCR3-Antagonisten gehört (Abb. 2.5). AMG487 enthält ein chirales Zentrum mit R-Konfiguration (29). Es inhibiert sowohl die CXCR3-vermittelte Zellmigration wie auch die Calciummobilisation (29).

Es wurden bereits erfolgversprechende tierexperimentelle Studien mit dem CXCR3-Antagonisten AMG487 zu onkologischen Fragestellungen durchgeführt. In einer Studie von Walser et al. (28) wurden Maustumorzellen eines Adenocarcinoms der Mamma mit dem CXCR3-Antagonisten AMG487 vorbehandelt und danach intravenös gespritzt. Die vorbehandelten Tumorzellen mit AMG487 entwickelten weniger Lungenmetastasen als die Kontrollgruppe (40 vs. 104) (28). Auch die subkutane Gabe von AMG487 hatte im Vergleich zum Vehikel einen signifikant hemmenden Effekt auf die Entwicklung von Lungenmetastasen (113 vs. 171) (28). Ebenso konnte durch Blockade des Chemokinrezeptors CXCR3 mit dem CXCR3-Antagonisten AMG487 die Lungenmetastasierung von Osteosarkomzellen im Mausmodell vermindert werden (45).

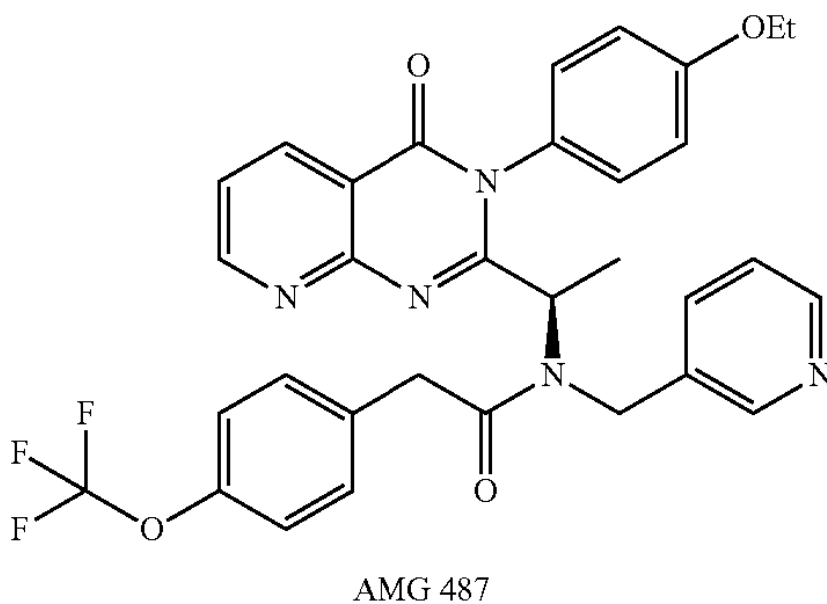


Abb. 2.5: Chemische Struktur des CXCR3-Antagonisten AMG487 (übernommen aus Ref. 54).

2.10 Fragestellung der Arbeit

Die Glomerulonephritis ist weltweit eine der häufigsten chronisch verlaufenden Nierenerkrankungen, die zu terminalen Nierenversagen führt. Bei fortgeschrittenem Verlust der Nierenfunktion sind Dialysebehandlung und Nierentransplantation die einzig möglichen Therapieformen. Die Kosten für die medizinische Versorgung für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz sind bereits heute immens, so dass durch die prognostizierte Zunahme der terminalen Niereninsuffizienz eine Kostenexplosion für die Versorgung dieser Patienten vorhergesagt wird (56). Diese Fakten stellen die dringende Notwendigkeit dar, neue Therapieansätze der Glomerulonephritis zu entwickeln.

Bisher stehen keine immunmodulatorischen Therapieansätze zu der Behandlung chronisch progredienter Glomerulonephritiden zu Verfügung. Insbesondere die Blockade der Infiltration von Entzündungszellen in erkranktes Nierengewebe stellt eine neuartige, attraktive Behandlungsstrategie dar.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass durch die Blockierung des Chemokinrezeptors CCR1 die Infiltration leukozytärer Effektorzellen in das Nierengewebe und die Progression chronisch entzündlicher Nierenerkrankungen zur Nierenfibrose mit dem einhergehenden Funktionsverlust des Organs verlangsamt werden kann (42, 43).

Allerdings konnte durch die Blockade von CCR1 nur eine 50%-ige Reduktion des Leukozyteninfiltrats und der Fibrose erreicht werden. Bisherige Daten weisen auf eine Rolle weiterer Chemokine und Chemokinrezeptoren in diesem Prozess hin. Die Infiltration aktivierter Lymphozyten, insbesondere von Th1-Zellen, scheint beispielsweise durch den Chemokinrezeptor CXCR3 sowie seinen Liganden vermittelt zu sein (44).

Tatsächlich wurde am Mausmodell einer Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis, der nephrotoxischen Serumnephritis, kürzlich gezeigt, dass das Fehlen des leukozytär exprimierten Chemokinrezeptors CXCR3 die renale Leukozyteninfiltration, Proteinurie und Nierenfunktionsverschlechterung vermindert sowie die glomeruläre Schädigung abschwächt.

Wegen der erfolgversprechenden Vordaten aus dem Knockout-Mausmodell sollten in der vorliegenden Arbeit erstmals Effekte einer pharmakologischen Blockade des Chemokinrezeptors CXCR3 mit dem kleinmolekularen Nichtpeptid-

Antagonisten AMG487 im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis in der Arbeitsgruppe etabliert. Anschließend erfolgten Interventionsstudien mit CXCR3-Blockade durch subkutane bzw. orale Gabe des CXCR3-Antagonisten AMG487.

3 Methoden und Material

3.1 Tierexperimentelle Methodik

3.1.1 Modell der Nephrotoxischen Serumnephritis

Das nephrotoxische Serum enthält polyklonale Antikörper gegen glomeruläre Basalmembranbestandteile. Es wird aus Kaninchen oder Schafen nach wiederholter Immunisierung mit murinen Glomeruluspräparationen gewonnen.

Nach intravenöser Injektion des Serums bilden sich durch die glomeruläre Ablagerung der anti-Basalmembran-Antikörper glomeruläre Immunkomplexe.

Im Rahmen der angeborenen Immunantwort werden nach Ablagerungen der Immunkomplexe das Komplementsystem, glomeruläre neutrophile Leukozyten und glomeruläre Makrophagen aktiviert. Dies führt nach Gabe einer entsprechend hohen Serumdosis zu einer akuten Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis (heterologe nephrotoxische Serumnephritis).

Auch die angeborene adaptive Immunantwort wird durch die Injektion und die glomeruläre Ablagerung der Kaninchenantikörper aktiviert: Die Maus bildet reaktive T-Zellen und autologe Antikörper, die gegen Kaninchen-Antikörper gerichtet sind.

Wird eine subnephritische, d.h. nach alleiniger Injektion nicht zu einer Glomerulonephritis-führende Serumdosis in zuvor gegen Kaninchen-Immunglobulin sensibilisierte Mäuse verabreicht, entwickelt sich über einen Zeitraum von drei Wochen eine T-Zell-abhängige, chronisch progrediente Glomerulonephritis mit Halbmondbildung und sekundärer interstitieller Nephritis. Diese ist durch renale Infiltration sensibilisierter T-Zellen und zusätzliche glomeruläre Ablagerung von autologen murinen anti-Kaninchen-Antikörpern gekennzeichnet. Diese autologe Form der nephrotoxischen Serumnephritis wurde als Modell einer chronisch progredienten Immunkomplex-Glomerulonephritis in der vorliegenden Arbeit verwendet.

3.1.2 Studienprotokoll

Die folgende Grafik zeigt den allgemeinen Studienablauf zur Induktion und Phänotypanalyse der nephrotoxischen Serumnephritis:

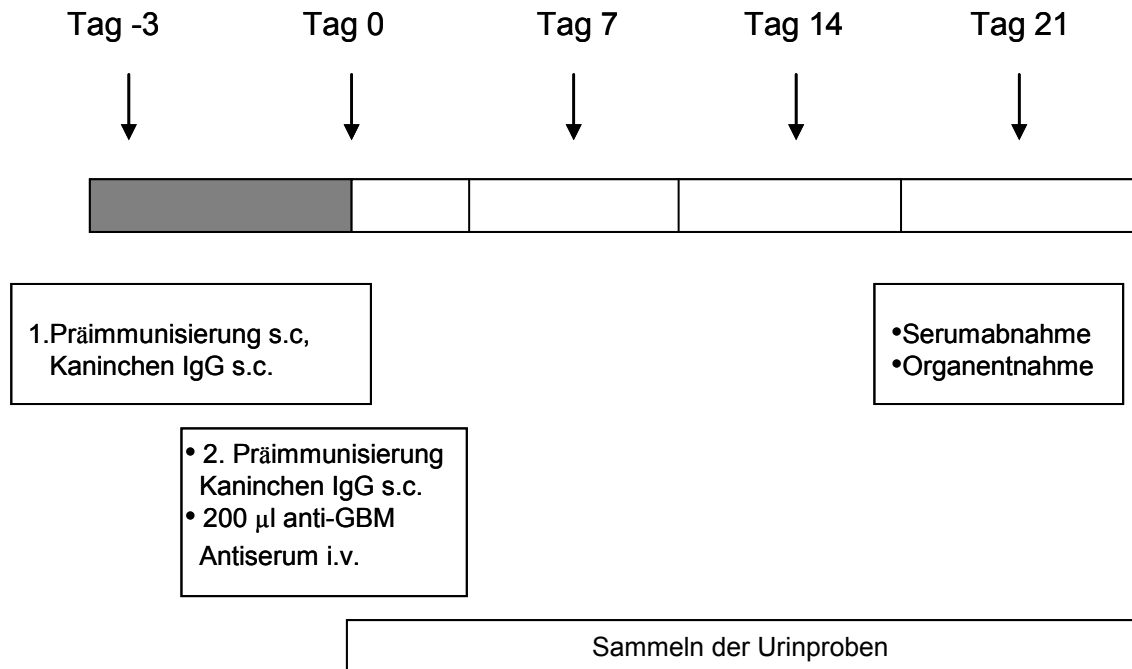


Abb. 3.1: Allgemeiner Studienablauf: Präimmunisierung am Tag -3 und 0; anti-GBM Antiserum am Tag 0; Tag 0-21 Urinproben; Serumabnahme und Organentnahme am Tag 21.

Am Tag -3 erfolgte die Präimmunisierung mit Kaninchen-Immunglobulin. Am Tag 0 wurde bei allen Experimenten das Anti-GBM Antiserum intravenös in die Schwanzvene injiziert. Spontanurinproben wurde am Tag 0, 7, 14 und 21 gesammelt. Am Tag 21 fanden die Serumabnahme und die Organentnahme statt.

3.1.3 Versuchstiergruppen

In den folgenden Versuchstiergruppen wurden die Effekte einer subkutanen oder oralen Gabe des CXCR3-Antagonisten AMG487 auf den Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis untersucht:

Tabelle 4: Aufteilung der Versuchsgruppen in den Interventionsstudien mit dem CXCR3 Antagonisten AMG 487 (subkutane und orale Gabe)

Experiment	Gruppe	Intervention
Studie 1	1 (n=15) (Kontrolle)	keine weitere Behandlung
	2 (n=10) (Vehikel)	Cyclodextrin 50 µl s.c. 2 x am Tag
	3 (n=8) (Antagonist)	CXCR3 Antagonist 10mg/kg in 50 µl Cyclodextrin s.c. 2 x am Tag
Studie 2	1 (n=10) (Kontrolle)	keine weitere Behandlung
	2 (n=4) (Vehikel)	125 µl Methylcellulose oral 2 x am Tag
	1 (n=4) (Antagonist)	CXCR3 Antagonist 30 mg/kg in 125 µl Methylcellulose oral 2x am Tag

3.1.4 Tierhaltung

Für die Experimente wurden sechs Wochen alte, männliche Mäuse des Stammes C57BL/6NCrl Wildtyp (Charles River, Sulzfeld) verwendet. Maximal 5 Tiere wurden in Macrolone Typ III Käfige unter SPF-Bedingungen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter (mouse diet, Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gehalten. Die Tiere waren in einem Stall untergebracht, in dem eine Temperatur von 20°C bis 22°C und eine Luftfeuchtigkeit von 50 % bis 60 % konstant gehalten wurde. Die Tierversuche wurden entsprechend des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Zur Betreuung der Tiere lag für die Doktorandin eine Ausnahmegenehmigung für die Durchführung von Tierversuchen vor.

3.1.5 Präimmunisierung

Zur Präimmunisierung wurde eine Emulsion aus Kaninchen-Immunglobulin (IgG) (Jackson ImmunoResearch, 11mg/ml) und komplettem Freund's Adjuvans (Sigma-Aldrich, Steinheim) hergestellt. zunächst erfolgte die Verdünnung des Kaninchen-IgGs mit PBS zu einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml. Daraufhin wurden jeweils 2 ml Kaninchen-IgG und kompletten Freund's Adjuvans gemischt und mit

der Ultraschallsonde zu einer Emulsion verarbeitet. Von dieser Emulsion wurden jeweils 100 µl in beide Flanken subkutan injiziert.

3.1.6 Intravenöse Injektion des nephrotoxischen Kaninchensersums

Als nephrotoxisches Serum wurde für alle Experimente hitzeinaktiviertes, sterilfiltriertes Kaninchenserum verwendet, das nach wiederholter Immunisierung eines Kaninchens mit murinen Glomeruluspräparationen gewonnen worden war. Es wurde uns freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation mit Frau Professor Tanya Mayadas, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital Boston, zur Verfügung gestellt. Zur Hitzeinaktivierung von Komplementfaktoren erfolgte die Erwärmung des Serums im Wasserbad auf 56°C für 30 min. Anschließend wurde das Serum durch 0,45 µm (Nalgene, Tuntenhausen, Deutschland) und 0,2 µm (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) Zelluloseazetat-Filter (sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Applikation am Tag 0 der Versuche erfolgte am nichtnarkotisierten Tier über die Schwanzvene mit einer 30G-Kanüle.

3.1.7 Applikation des CXCR3-Antagonisten AMG487

Der CXCR3-Antagonist AMG487 wurde uns freundlicherweise von der Firma Amgen, Thousand Oaks, Kalifornien zur Verfügung gestellt.

In der Versuchsreihe mit subkutaner Gabe wurde AMG487 in einer Konzentration von 10 mg/kg in 50 µl 20-%igen beta-Cyclodextrin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelöst.

Die Injektion erfolgte zweimal täglich in einem Rhythmus von 12 Stunden. Dazu wurde die Maus am Rücken mit einer Hand fixiert und am Übergang zwischen Bauch und Rücken wurde - je nach Gruppe - 50 µl CXCR3 Antagonist in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht oder das gleiche Volumen 20% Cyclodextrin subkutan injiziert.

Für die orale Gabe wurde der CXCR3-Antagonist in 1% Methylcellulose gelöst. 125 µl des gelösten Antagonisten in einer Konzentration von 30 mg/kg Körper-

gewicht bzw. das gleiche Volumen Methylcellulose wurden alle 12 Stunden mittels oraler Gavage verabreicht.

3.1.8 Urinentnahme

Einmal pro Woche wurde Spontanurin gesammelt und das Ausmaß der Proteinurie mittels Urinstix (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, USA) bestimmt.

3.1.9 Gewinnung von EDTA- Blut und Serum

Zur Gewinnung von Blut wurde die Maus mit 300 µl Avertin (2,5%) intraperitoneal narkotisiert. Die Blutentnahme erfolgte vor Euthanasie mit Natriumheparinisierten Kapillaren (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) aus dem retrobulären Venenplexus des medialen Augenwinkels. Durch leichtes Drehen verletzte man den Venenplexus und das Blut wurde in zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße gesammelt. In einem der Eppendorf-Gefäße war zuvor 5 µl EDTA vorpipettiert.

3.1.10 Entnahme und Fixation von Gewebe

Unter Avertinnarkose wurde die Maus am Versuchsende (Tag 21) an ihren Extremitäten mit Kanülen fixiert und eine mediane Laparotomie durchgeführt. Das Darmkonvolut wurde aus dem Bauchraum luxiert ohne das Lumen zu öffnen.

Die Nieren wurden mit PBS durchspült. Dazu eröffnete man die Vena cava und injizierte in den rechten Vorhof mit einem Druck von 60 mmHG PBS. Daraufhin wurden die Nieren entnommen und gedrittelt. Ein Ober- und Unterpol wurde für die Weiterverarbeitung zur Nierenzellisolation verwendet, der zweite Oberpol wurde in RNA-later (Qiagen, Hilden, Deutschland), die Mittelstücke in 4 %-iges Formalin eingelegt und der zweite Unterpol für Gefrierschnitte in Eindeckmedium fixiert.

3.2 Durchflusszytometrie (FACS)

3.2.1 Nierenzellisolation

Der Unter- und Oberpol wurden in eine auf Eis gelagerte Petrischale mit 2 – 5 ml Parispuffer überführt und mit einem Skalpell in ca. 0,5 mm große Stücke zerkleinert. Diese Gewebestücke überführte man mittels einer 10 ml Spritze (ohne Kanüle) in ein mit 10 ml eisgekühltem Paris-Puffer gefülltes Greinerröhrchen. Nach dem 5 minütigen Zentrifugieren mit 250 g bei 4°C wurde der Überstand abgossen und die Pellets in 10 ml eisgekühltem HBSS (mit Ca, Mg) resuspendiert. Es erfolgte ein erneutes Zentrifugieren mit 250 g bei 4°C für 5 Minuten.

Nach Abgießen des Überstandes wurde die Suspension mit Kollagenase/DNase verdaut, indem jeweils 5 ml vorgewärmte Kollagenase/DNase-Lösung zugegeben und bei 37°C für 20 Minuten im Wasserbad unter gelegentlichem Mischen inkubiert wurde.

Jetzt wurde wieder mit 250g bei Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert und der Überstand danach verworfen. Nach Zugabe von 5 ml 2 mM EDTA in HBSS (ohne Ca, Mg) wurde die Suspension für 20 min bei 37°C inkubiert. Nun wurde mit 30g bei 4°C für 5 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein vorgekühltes Greinerröhrchen überführt und auf Eis gebettet. Das verbleibende Pellet wurde mit 5 ml vorgewärmter Kollagenase-Lösung bei 37°C für 20 min mit gelegentlichem Mischen verdaut.

Nachfolgend wurde die Suspension in eine eisgekühlte Petrischale überführt, mit einer 10 ml Spritze aufgezogen und durch eine 19G-Kanüle ausgespritzt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Es folgten nun zwei Durchgänge mit einer 26G-Kanüle. Zuletzt wurde die Suspension durch eine 30G-Kanüle in den vorher auf Eis gelagerten Überstand gespritzt und alles zusammen mit 250g bei Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Nach Resuspension der Pellets in 10 ml eisgekühltem DPBS (ohne Ca, Mg), wurden diese mit 250g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die Pellets wurden in 1ml FACS-Puffer gelöst und anschließend durch einen mit 1 ml DPBS angefeuchteten Cell Strainer (70 µm) in ein Greinerröhrchen gefiltert. In dieses wurde 10 ml DPBS zugegeben. Das Filtrat wurde mit 250g bei 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Je nach Größe der Pellets erfolgte die Resuspension der Pellets in 200 bis 500 µl FACS-Puffer.

3.2.2 Antikörperfärbung zur durchflusszytometrischen Charakterisierung und Quantifizierung von Leukozytenpopulationen

Zur Quantifizierung der infiltrierenden renalen Leukozytenpopulationen in nephritischen Nieren wurden zur Blockierung unspezifischer Bindungen je 100 µl der renalen Einzelzellsuspension in ein mit 5 µl Rattenserum und 5 µl Mausserum bestücktes FACS-Röhrchen pipettiert, gevortext und 10 min auf Eis inkubiert.

Es folgte die Zugabe der jeweiligen Antikörper (1,4 µl, Verdünnung 1:75). Zum Nachweis von T-Zellen wurde mit CD45-PE (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland), CD3-FITC (BD Bioscience), CD4-APC (BD Bioscience) und CD8-CyC (BD Bioscience) gefärbt. Die Makrophagen wurden mit F4/80-FITC (AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland) und CD45-PE (BD Bioscience) markiert. Nach 60 min Inkubation im Dunklen, wurden die Lösungen zweimal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde die Suspension bis auf 300 µl abgesaugt und das Pellet für die nachfolgende FACS-Messung resuspendiert.

In einigen Experimenten erfolgte die zusätzliche Anfärbung von CD4- und CD8-positiven Zellen im peripheren Blut. Hierfür wurde zu je 100 µl EDTA-Blut jeweils 5 µl Mausserum und 5 µl Rattenserum hinzupipettiert und gemischt. Es folgte eine Inkubation von 10 min auf Eis. Anschließend wurden je 1,4 µl der jeweiligen Antikörper hinzugefügt: CD45-PE (BD Bioscience), CD3-FITC (BD Bioscience), CD4-APC (BD Bioscience) und CD8-CyC (BD Bioscience). Nach einstündigem Inkubieren im Dunklen wurden 2 ml Lyse/Fixierungspuffer (1:10 verdünnt; BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) hinzugegeben, gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschgänge mit 2 ml FACS-Puffer, zentrifugiert wurde mit 250g bei 4°C. Abschließend wurde der Überstand bis auf 300 µl abgesaugt und das Pellet für die nachfolgende FACS-Messung resuspendiert. Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten konnten zusätzlich aufgrund ihrer Größe und Granularität identifiziert werden.

3.2.3 Antikörperfärbung zur durchflusszytometrischen Bestimmung der CXCR3-Oberflächenexpression auf T-Zellen

In einigen Experimenten wurde der Anteil CXCR3-positiver CD4- und CD8-T-Zellen im peripheren Blut und nephritischen Nieren untersucht. Hierfür wurden die T-Zellen wie in Punkt 3.2.2 beschrieben durch Anfärben mit CD3-FITC (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland), CD4-APC (BD Bioscience) und CD8-CyC (BD Bioscience) identifiziert und gleichzeitig mit einem PE-konjugierten anti-CXCR3-Antikörper (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) im Vergleich zur entsprechenden Isotypkontrolle gefärbt.

3.2.4 Messung

Bei der Durchflusszytometrie passieren Zellen hintereinander angeordnet einen fokussierten Laserstrahl. Die hierbei entstehende Streuung des Lichtes ist proportional sowohl zur Zellgröße (Vorwärtsscatter, FSC) als auch zur Zellgranularität (Seitwärtsscatter, SCL). Mit Hilfe der Software graphisch ausgewertet, können dadurch unterschiedliche Zelltypen einer Gesamtpopulation voneinander abgegrenzt und separat weiter untersucht werden. Darüber hinaus kann die Expression von Oberflächenmolekülen einzelner Zellen bestimmt werden. Hierzu verwendet man mit verschiedenen Fluorochromen markierte Antikörper, die spezifisch gegen ein bestimmtes zelluläres Antigen gerichtet sind. Passieren die Zellen den Laserstrahl, werden die Fluorochrome angeregt und emittieren ein Signal mit für das entsprechende Fluorochrom typischer Wellenlänge. Diese wird von einem Sensor erfasst. Die Fluoreszenzintensität ist hierbei proportional der Anzahl markierter Moleküle auf jeder Zelle. Das Ergebnis wird graphisch zweidimensional als Punktwolke für jeweils zwei Antikörper dargestellt. Durch morphologische Abgrenzung der für das gemessene Oberflächenmolekül deutlich positiven Zellen von den negativen Zellen mit unspezifisch geringer Fluoreszenz kann man deren prozentualen Anteil an der Gesamtpopulation bestimmen.

Die Analysen wurden mit einem 4-Farben-Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Bioscience, Heidelberg) durchgeführt und mit der Software CellQuest ausgewertet.

3.3 Anti-Kaninchen-IgG-Bestimmung im Serum

Autologe anti-Kaninchen-IgG-Spiegel im Serum wurden mittels ELISA bestimmt. Dazu wurde die Platten am Vorabend mit Kaninchen-IgG, verdünnt in Carbonatpuffer, beschichtet (200 µl IgG 10 mg/ml und 20 ml Carbonatpuffer). In jede Vertiefung wurden 100 µl pipettiert. Die Platten inkubierten über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Tag wurden die Platten mit PBS/Tween (150µl/Vertiefung) dreimal gewaschen. Zur Blockierung wurde jeweils 125 µl PBS/Tween/BSA 0,5% aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten erneut drei Waschgänge.

Es wurden jeweils 100 µl der Proben in folgenden Verdünnungen aufgetragen: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800. Von jeder Probe wurde eine dreifache Bestimmung durchgeführt.

Nach einer Inkubation von zwei Stunden und dreimaligem Waschen wurden 100 µl des Sekundärantikörpers goat-anti-mouse-IgG-FITC in einer Verdünnung von 1:250 aufgetragen (80µl AK + 20 ml PBS/Tween/BSA 0,5 %).

Nach weiteren zwei Stunden Inkubation und drei Waschgängen wurde in jede Vertiefung 100 µl PBS/Tween/BSA 0,5% pipettiert und die Platten mit dem ELISA Reader (XFluor) ausgewertet.

3.4 Laborchemische Bestimmungen im Serum

Kreatinin, Harnstoff, Gesamtprotein und Cholesterin wurden im Synlab Labor, Augsburg, mittels eines Autoanalysers (Olympus AU 2007, Olympus AU 640) bestimmt.

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Vorbereitung der Paraffinschnitte

Zunächst wurden die Schnitte in 4 %-igem Formalin fixiert und nach 24 Stunden in 70 % iges Ethanol überführt. Nach der Einbettung in Paraffin wurden mittels eines Mikrotoms (Jung, CM 3000, Leica, Bensheim) 4 µm dünne Schnitte herge-

stellt. Die Schnitte wurden auf einen mit APES beschichteten Objektträger aufgezogen und 12 Stunden bei 37 °C in einem Trockenschrank inkubiert.

Als erster Schritt bei jeder Färbung wurden die Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 50%) entparaffiniert und in wässrige Lösung gebracht.

3.5.2 PAS-Färbung

Die PAS-Färbung dient zum Nachweis von Aldehydgruppen, die durch Oxidation von 1,2-Glykolen mit Perjodsäure gebildet werden, mittels Schiff'schem Reagenz. PAS-positive Materialien wie Muzine stellen sich rosa bis purpurrot dar, durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin stellen sich die Zellkerne blau dar. Die Präparate wurden zunächst nach o. g. Methode entparaffiniert. Die Oxidation erfolgte durch Einstellen in 1%-iger Perjodsäure für einen Zeitraum von 10 Minuten. Nach Spülen mit entmineralisiertem Wasser wurden die Schnitte für 3 bis 5 Minuten in Schiff'sche Reagenz eingebracht. Anschließend wurde zunächst für eine Minute mit Sulfitwasser gespült und dann 10 Minuten gewässert. Vor erneutem Spülen in fließendem Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun. Schließlich wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe und mit Xylol entwässert und mit Deckgläschen versehen.

Verwendete Reagenzien:

1. 1%ige Perjodsäure-Lösung (1g Perjodsäure in 100 ml Aqua dest.)
2. Schiff'sche Reagenz (40 ml Schiff'sche Reagenz + 60 ml Aqua dest.)
3. SO₂-haltige Spülflüssigkeit (200 ml Aqua dest., 10 ml 10%iger Natriumbisulfit-Lösung versetzt, 10 ml HCl 1M)
4. Hämalaun-Lösung

3.5.3 Auswertung der histologischen Präparate

Es wurden pro Maus 100 PAS-gefärbte Glomeruli (Vergrößerung 400-fach) auf einer Skala von 0 bis 3 bewertet, wobei 0 keinen Veränderungen und 3 starker Sklerose entsprachen. Aus den 100 Werten pro Tier wurde ein Mittelwert gebil-

det. Die Auswertung erfolgte verblindet nach Überkleben der Identifikationsnummern.

3.5.4 Immunhistologie

Diese wurde mittels der Avidin-Biotin Methode durchgeführt, welches eine 2-Schritt-indirekte Methode ist.

Zunächst bindet der Primärantikörper an das zu bestimmende Antigen. Daraufhin wird ein zweiter, enzymmarkierter Sekundärantikörper aufgetragen, der gegen die Fc-Region des Primärantikörpers gerichtet ist. Danach folgt die Substrat-Chromogenreaktion.

3.5.4.1 Antigenfreilegung

Um die Antigene für den Primärantikörper besser zugänglich zu machen, wurden diese zunächst demaskiert. Dies erfolgte mittels eines Autoklaven, bei dem man die Proteinspaltung durch Druck und Temperatur erreicht. Die Gewebeschnitte wurden 30 Minuten bei 2 bar in Citratpuffer autoklaviert (Autoklav 23, Melag Medizintechnik, Berlin) und vor der Weiterverarbeitung 15 Minuten in Citratpuffer abgekühlt.

3.5.4.2 Blockierung

Um ein falsch positives Ergebnis durch Kreuzreaktion mit endogenen Substanzen zu vermeiden, wurden folgende Blockierungen vorgenommen:

- Endogene Peroxidase: Peroxidase Blocking Reagent , 8 min Inkubation
- Endogenes Avidin: Avidinlösung, 15 min Inkubation
- Endogenes Biotin: Biotinlösung, 15 min Inkubation

Zwischen Entparaffinieren (vgl. 3.5.1.), Antigenfreilegung und Blockierung wurden die Schnitte jeweils 5 min mit PBS gewaschen.

3.5.4.3 Färbeprotokoll

Zunächst wurde auf die Schnitte 20 µl des verdünnten Primärantikörpers aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Nach 5-minütigem Waschen mit PBS wur-

den ebenfalls 20 µl des Sekundärantikörpers hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation des Labelkomplexes wurde das Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol aufgetragen und unter dem Mikroskop die Signalintensität kontrolliert. Sobald die optimale Intensität erreicht wurde, stoppte man die Reaktion mit PBS. Nach 10 Minuten erfolgte die Gegenfärbung für 30 Sekunden mit Hämalaun und ein reichliches Spülen mit Leitungswasser. Nach weiteren 10 Minuten konnten die Schnitte mit dem Fixans Aquatex eingedeckt werden.

Tabelle 5: Für die Immunhistologie angewandte Primärantikörper

Antigen	Antigenfreilegung	Blockierung	Verdünnung	Hersteller	Sekundärantikörper
CD3	Autoklav mit Citratpuffer	Peroxidaseblock Avidin-Biotinblock	1:50	Serotec, Oxford, England	anti-Ratte 1 :100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
ER-HR3	Autoklav mit Citratpuffer	Peroxidaseblock Avidin-Biotinblock	1:100	BMA, Augst, Schweiz	anti-Ratte 1 :100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

3.5.4.4 Immunhistologische Quantifizierung des renalen Leukozyteninfiltrats

Je Schnitt wurden in zehn zufällig ausgewählten Blickfeldern (Vergrößerung 400-fach) die positiv gefärbten Zellen gezählt und der Mittelwert daraus gebildet.

Die Auswertung erfolgte verblindet nach Überkleben der Identifikationsnummern.

3.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die SPSS-Software, Version 11.0 (SPSS Inc. Chicago, USA) verwendet. Von den gesammelten Daten wurden der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts berechnet. Zur Berechnung der Signifikanz wurde bei Vergleich zweier Versuchsgruppen der zweiseitige, nichtparametrische Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Wurden drei Versuchsgruppen verglichen, erfolgte zunächst der Kruskal-Wallis-Test. Statistisch signifikante Un-

terschiede zwischen den Vergleichsgruppen wurden bei einem $P < 0,05$ angenommen.

3.7 Lösungen und Reagenzien

3.7.1 Chemikalien

Tabelle 6: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
AMG 487	Amgen, Thousand Oaks, Californien
Beta-Cyclodextrin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CD3-Antigen	Serotec, Oxford, England
CD4-APC	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD3-FITCS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD8-CyC	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD45-APC	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD45-PE	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CXCR3-PE	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DNAse Typ III	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eindeckmedium	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
ERHR3-Antigen	BMA, Augst, Schweiz
F4/80-FITCS	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Formalin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Freunds adjuvans	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Goat-anti-mouse IgG-FITC	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
HRP-goat-anti-mouse Albumin	Bethyl, Montgomery, Texas
Kaninchen-IgG	Jackson ImmunoResearch, Newmarket
Lysing-Puffer	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Mausserum	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
Methylcellulose 2 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Purified-anti-mouse Albumin	Bethyl, Montgomery, Texas
Rattenserum	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
RNA-later	Qiagen, Hilden, Deutschland
TMB-Substrat	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

3.7.2 Lösungen

Methylcellulose 1 %

10 g Methylcellulose 2 % in
800 ml Aqua dest lösen und bis 1000 ml auffüllen.

Avertin 100 %

10 g 2,22 Tribrommenthanol
10 ml tetra-amyl-Alkohol

Avertin 2,5 %

1,25 ml Avertin 100 %
50 ml steriles PBS
bei 65°C 15 bis 30 min lösen

FACS-Puffer

0,5 g Na Azid in
500 ml DPBS lösen und
1 g BSA hinzugeben

Paris Puffer

2,42 g Tris
7,31 g NaCl
0,75 g KCL
0,82 g Na-Acetat
0,9 g D-Glukose
in 900 ml Aqua dest lösen, pH-Wert mit 0,1 N HCL auf 7,4 einstellen und auf
1000 ml mit Aqua dest auffüllen.

10 x HBSS mit Calcium und Magnesium

4 g KCL

0,6 g KH_2PO_4

80 g NaCl

0,62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

3,5 g NaHCO_3

1,4 g CaCl_2

1,0 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

1,0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

10 g D-Glukose

in 900 ml Aqua dest lösen, pH-Wert mit 1 N HCL auf 7,4 einstellen und auf 1000ml mit Aqua dest auffüllen

10 x HBSS ohne Calcium und Magnesium

4 g KCL

0,6 g KH_2PO_4

80 g NaCl

0,62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

auf 1000 ml mit Aqua dest auffüllen und autoklavieren

DNase-Stammlösung (1mg/ml)

DNase (TypIII) 15.000 U / 6 mg (Sigma)

1 mg / ml Stammlösung im Liefergefäß ansetzen:

Zugabe von 6 ml 50% Glycerol in

20 mM Tris/HCL (pH 7,5), 1 mM MgCl_2

Ansatz der 50% Glycerol in 20 mM Tris/HCL, 1 mM MgCl_2 :

0,48 g Tris-Puffer plus 100 ml H_2O auf pH 7,4 einstellen = 40 mM

50 ml Glycerol 100% plus 50 ml obiger 40 mM Tris-Lösung = 20 mM

Zugabe von 100 μl 1 mM MgCl_2 Lösung

Kollagenase/DNAse-Lösung

10 mg Kollagenase Typ I (1,0 mg/ml; Sigma)

1 ml DNAse-Stammlösung

in 9 ml 1 x HBSS mit Calcium und Magnesium lösen, bei 37°C im Wasserbad vorwärmen

Kollagenase-Lösung

10 mg Kollagenase Typ I (1,0 mg/ml; Sigma)

in 10 ml HBSS mit Calcium und Magnesium lösen, bei 37°C im Wasserbad vorwärmen

2 mM EDTA

7,44 mg EDTA in

10 ml HBSS ohne Calcium und Magnesium lösen, bei 37°C im Wasserbad vorwärmen

Carbonatpuffer pH 9,6

1,59 g Na_2CO_3

2,93 g NaHCO_3 in

1 l Millipore- H_2O lösen

PBS-Tween

16 g NaCl

0,4 g KH_2PO_4

5,8 g Na_2HPO_4

0,4 g KCl

2,0 g NaN_3

1 ml Tween 20

mit Aqua dest auf 2 Liter auffüllen

Blockierungslösung

PBS-Tween plus 0,5 % BSA

Schwefelsäure 2 M

76 ml H_2SO_4

224 ml Aqua dest

4 Ergebnisse

4.1 Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis unter subkutaner Gabe des CXCR3-Antagonisten AMG487

4.1.1 Nierenfunktion und nephrotisches Syndrom

Am Tag 21 der nephrotoxischen Serumnephritis waren Serumkreatinin- und Harnstoffwerte als Maß der exkretorischen Nierenfunktion bei den Tieren aller drei Versuchsgruppen im Vergleich zu unbehandelten nichtnephritischen Mäusen (Strichlinie in Abb. 4.1) erhöht. Im Vergleich zur Vehikelkontrolle zeigten die AMG487-behandelten Tiere eine geringe, jedoch nicht signifikante Tendenz zu einem niedrigeren Serumkreatininwert, die Harnstoffwerte waren dagegen vergleichbar. Im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe sieht man bei den Vehikel-behandelten Tieren, wie auch verstärkt bei den mit dem CXCR3-Antagonisten behandelten Mäusen, eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Verminderung der Kreatinin- und Harnstoffwerte (Abb. 4.1).

Die laborchemischen Kriterien eines nephrotischen Syndroms (Hypoproteinämie und Hypercholesterinämie) wurden von allen Tieren erfüllt. Allerdings ergaben sich zwischen unbehandelten, Vehikel- und AMG487-behandelten nephritischen Tieren keine signifikanten Unterschiede der Serumproteinwerte. Dagegen kam es im Vergleich zu unbehandelten Mäusen sowohl in der Vehikel-behandelten Gruppe als auch in der CXCR3-Antagonisten-Gruppe zu einer signifikanten Abschwächung der Hypercholesterinämie um 36,2% bzw. 38,4% (Abb. 4.1). Die Werte der AMG487- und der Vehikel-behandelten Tiere sind hierbei jedoch vergleichbar.

Diese Ergebnisse sprechen im Vergleich zu unbehandelten nephritischen Kontrolltieren für tendenziell verbesserte funktionelle Parameter sowohl der Vehikel- als auch AMG487-behandelten Mäuse, ohne zusätzlich spezifischen Effekt der AMG487-Behandlung im Vergleich zur Vehikelgruppe.

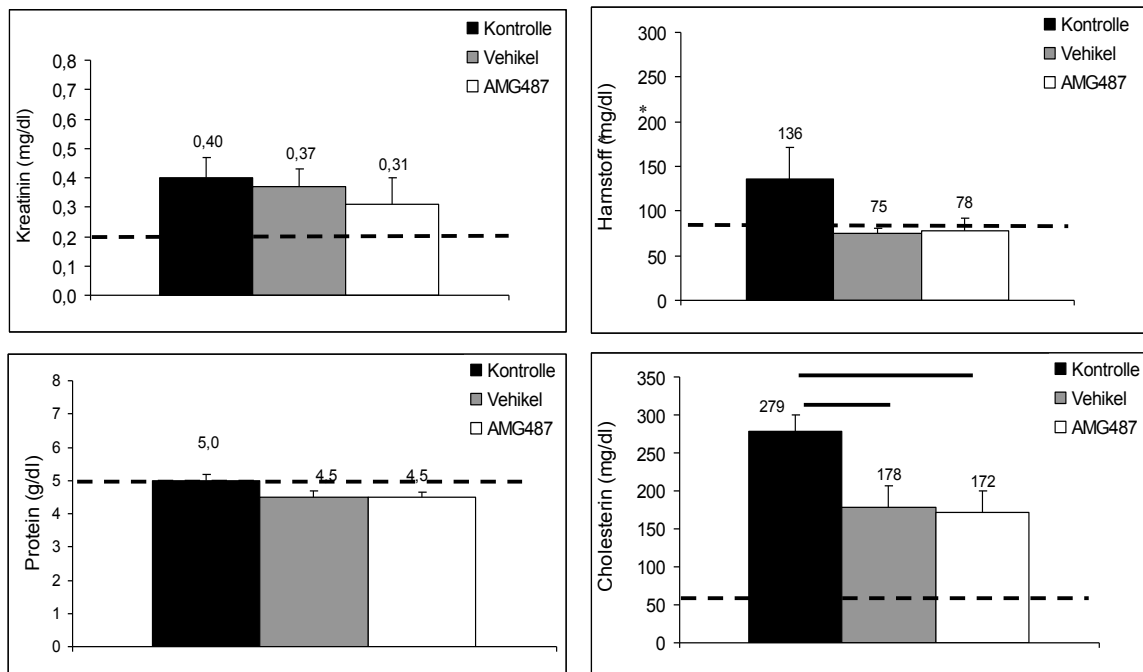


Abb. 4.1: Serumwerte der Interventionsstudie mit subkutaner Gabe des CXCR3-Antagonisten. Es zeigt sich eine nicht signifikante Tendenz zur Verbesserung der Nierenretentionsparameter in der Vehikel- und AMG487-behandelten Gruppe im Vergleich zur nichtbehandelten Kontrollgruppe. Die Gesamtproteinwerte sind in den drei Versuchsgruppen vergleichbar. Dagegen zeigt sich eine signifikante Verbesserung der Hypercholesterinämie bei den mit den Vehikel- und CXCR3-Antagonisten behandelten Tieren (* $p < 0,05$). Die gestrichelte Linie gibt die gemessenen Durchschnittswerte von unbehandelten Wildtypmäusen an.

4.1.2 Proteinurie

Zur Verlaufskontrolle der Proteinurie wurden wöchentlich Urinproben gesammelt und diese mittels Stix auf Proteingehalt getestet. Wie in Abbildung 4.2 dargestellt, zeigt sich bei den mit dem CXCR3-Antagonisten behandelten Mäusen im Vergleich zur nichtbehandelten Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung der Proteinurie bereits am Tag 14, die auch im weiteren Verlauf bis Tag 21 anhält. An Tag 21 ist ebenfalls im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren eine signifikante Verbesserung der Proteinurie bei den mit AMG487-behandelten Tieren zu beobachten.

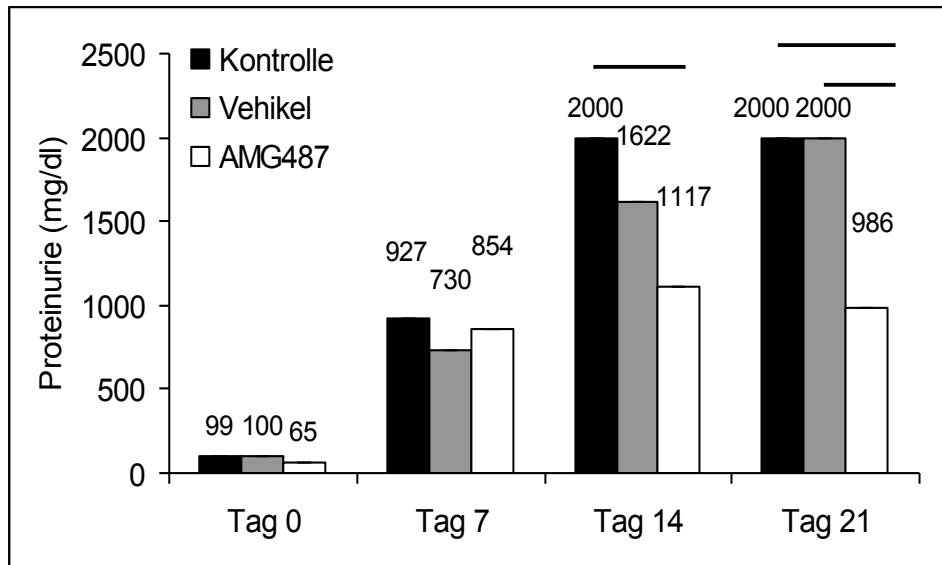


Abb. 4.2: Wöchentlicher Verlauf der Proteinurie (* $p < 0.05$).

4.1.3 Nachweis autologer anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper

Um zu untersuchen, ob die AMG487-Behandlung die systemische Immunantwort im Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis beeinflusst, wurden die Titer der autologen anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper im Serum mittels ELISA bestimmt. Die Tiere aller drei Versuchsgruppen entwickelten deutliche Antikörperspiegel. Titer in Vehikel- und AMG487-behandelten Mäusen waren identisch, mit geringer, jedoch nicht signifikanter Erhöhung gegenüber unbehandelten nephritischen Kontrolltieren (Abb. 4.3).

Diese Ergebnisse belegen eine intakte systemische Immunantwort auch in Mäusen, die mit dem CXCR3-Antagonisten behandelt werden.

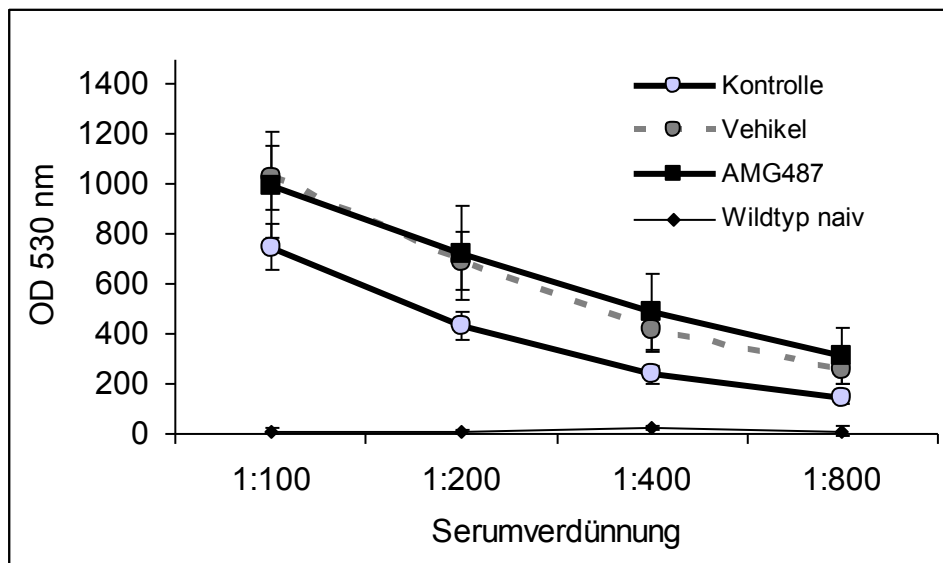


Abb. 4.3: Nachweis autologer anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper. Die Antikörper wurden am Tag 21 nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis mittels ELISA gemessen. Die Titerwerte der Verdünnungsstufen sind in arbiträren Einheiten angegeben.

4.1.4 Glomerulosklerose

Das chronische autologe Modell der nephrotoxischen Serumnephritis ist durch eine zunehmende glomeruläre Matrixablagerung und Sklerosierung charakterisiert. Histologisch wird dies durch Zunahme glomerulärer PAS-positiver Ablagerungen deutlich (Abb. 4.4). Die semiquantitative morphometrische Auswertung zeigte eine deutliche glomeruläre Deposition PAS-positiven Materials in den unbehandelten nephritischen Kontrolltieren. Im Vergleich von AMG487-behandelter Versuchsgruppe und Vehikelgruppe ergab sich eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Verminderung der glomerulären Matrixablagerung. Im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe war sowohl in der Vehikelgruppe wie auch verstärkt in der Antagonistengruppe eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Reduktion der glomerulären PAS-positiven Ablagerungen um 41,0% bzw. 62,8% zu beobachten (Abb. 4.5). Diese tendenziell verminderte glomeruläre Schädigung sowohl in der Vehikel- wie auch in der AMG487-behandelten Versuchsgruppe korreliert mit der aufgezeigten Verbesserung der funktionellen Parameter beider Versuchsgruppen. Die glomeruläre Matrixreduktion ist in AMG487-behandelten Mäusen am stärksten ausgeprägt, was mit der nur in AMG487-behandelten Mäusen nachweisbaren signifikanten Reduktion der Proteinurie einhergeht.

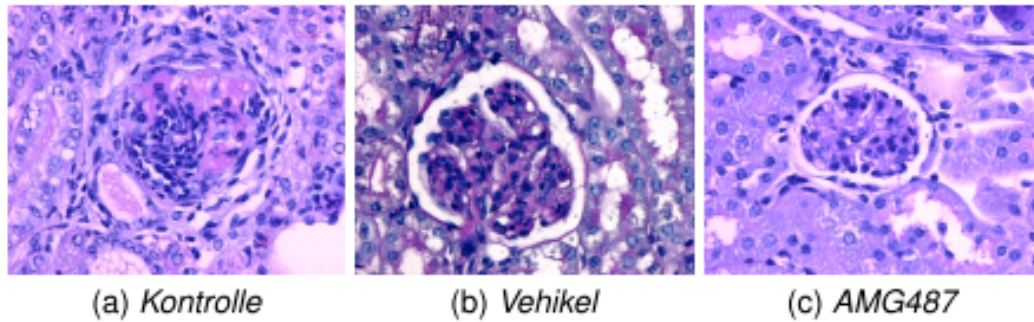


Abb. 4.4: PAS-positive glomeruläre Ablagerungen in unbehandelten nephritischen Kontrolltieren, Vehikel- und AMG487-behandelten Tieren am Tag 21 der nephrotoxischen Serumnephritis. Dargestellt sind repräsentative Glomeruli jeder Versuchsgruppe. PAS-Färbung, (Originalvergrößerung x400).

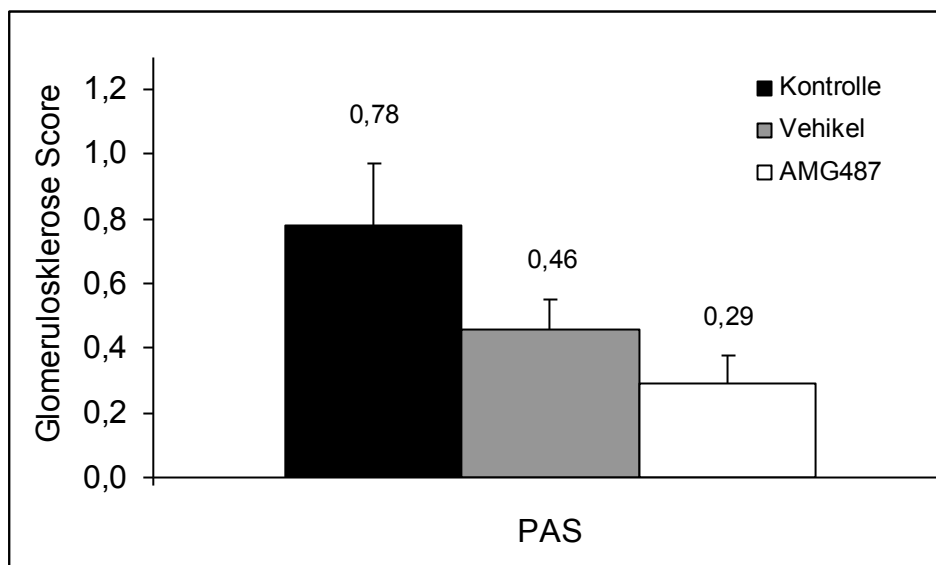


Abb. 4.5: Semiquantitative Auswertung der glomerulären PAS-Ablagerungen am Tag 21. Im Vergleich zu unbehandelten nephritischen Kontrolltieren kam es sowohl in der Vehikelgruppe als auch verstärkt in der AMG487-behandelten Gruppe zu einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Reduktion der PAS-positiven Ablagerungen in Glomeruli.

4.1.5 Durchflusszytometrische Quantifizierung des renalen Leukozyteninfiltrats

Zur Quantifizierung des Leukozyteninfiltrats in nephritischen Nieren wurde in Einzelzellsuspensionen der Gesamtnieren der relative Anteil CD45-positiver Leukozyten, CD4- und CD8-positiver T-Zellen sowie F4/80-positiver Makrophagen durchflusszytometrisch ermittelt.

Im Vergleich zur Vehikelkontrolle war die Leukozytenzahl in AMG487-behandelten Tieren tendenziell, jedoch nicht signifikant vermindert. Dagegen zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten nephritischen Kontrolltieren sowohl in der Vehikel- als auch in der AMG487-behandelten Versuchsgruppe eine signifikant verminderte renale Infiltration CD45-positiver Leukozyten um 57,3% bzw. 67,0%. (Abb. 4.6).

Die AMG487-Behandlung führte zu einer tendenziellen Reduktion der infiltrierenden CD4 T-Zellen um 57,3% im Vergleich zur Vehikelkontrolle und zu einer signifikanten Reduktion der infiltrierenden CD4 T-Zellen um 74,1% im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrolle. In der Vehikel-behandelten Gruppe ergab sich gegenüber den unbehandelten nephritischen Kontrollen keine signifikante Veränderung der CD4-positiven T-Zellen. Die CD8 T-Zellzahlen verhielten sich tendenziell ähnlich wie die CD4-Zellen, die Veränderungen waren jedoch nicht signifikant (Abb. 4.6).

Die Zahl renaler F4/80-positiver Makrophagen war im Vergleich zur Vehikelkontrolle unter AMG487-Behandlung tendenziell geringer, jedoch nicht signifikant reduziert. Im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe war die renale Makrophagenzahl jedoch sowohl in der AMG487- als auch weniger deutlich in der Vehikelgruppe um 68,7% bzw. 49,1% signifikant reduziert (Abb. 4.6).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Reduktion des renalen Leukozyteninfiltrats unter AMG487-Behandlung im Vergleich zur Vehikelkontrolle. Dagegen bewirkt die Vehikelbehandlung selbst bereits eine signifikante Reduktion des renalen Leukozyteninfiltrats (CD45-positiv Zellen und Makrophagen) im Vergleich zu unbehandelten nephritischen Kontrolltieren. Diese gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe signifikante Reduktion renaler Leukozyten ist tendenziell ausgeprägter in der AMG487-behandelten Gruppe.

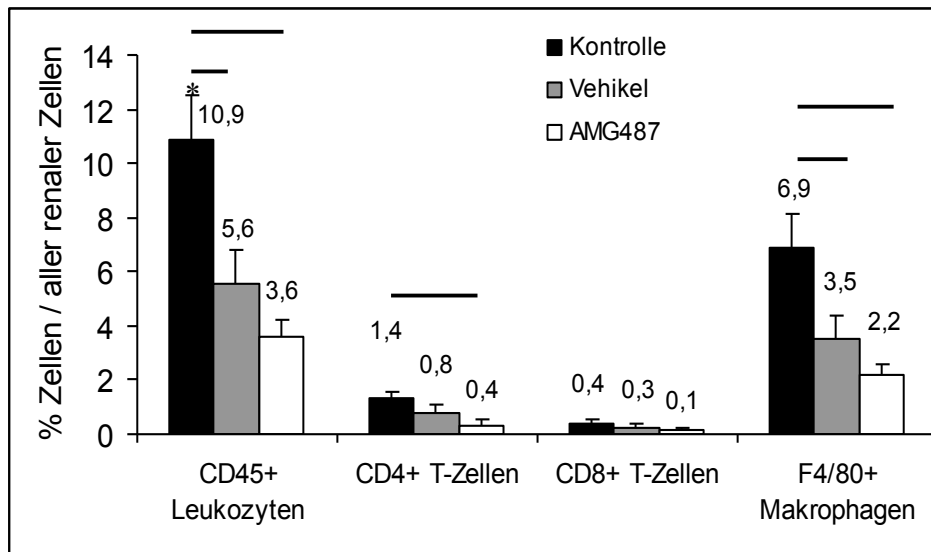


Abb. 4.6: Durchflusszytometrische Quantifizierung des renalen Leukozyteninfiltrats an Tag 21 der nephrotoxischen Serumnephritis (* $p < 0.05$).

4.1.6 Immunhistologischer Nachweis des renalen Leukozyteninfiltrats

Ergänzend zur durchflusszytometrischen Analyse wurde die renale Leukozyteninfiltration am Tag 21 immunhistologisch im renalen Kortex untersucht. Wie in Abb. 4.7 dargestellt kam es in unbehandelten nephritischen Kontrolltieren zu einer deutlichen interstitiellen Einwanderung von CD3-positiven T-Lymphozyten und ER-HR3-positiven Makrophagen, während nur ein geringes glomeruläres Leukozyteninfiltrat nachweisbar war. Im Vergleich zur Vehikelkontrolle lässt sich in der AMG487-behandelten Gruppe eine tendenziell, jedoch nicht signifikant verminderte Infiltration von CD3-positiven T-Zellen in das Nierengewebe erkennen. Im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe ergab sich in Vehikel- als auch verstärkt in AMG487-behandelten Tieren eine nicht signifikante Reduktion der interstitiellen CD3-Zellen (Abb. 4.8).

Das Ausmaß der Makrophageninfiltration war dagegen in Vehikel- und AMG487-behandelten Mäusen identisch. Allerdings zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrolle in beiden Gruppen eine signifikante Reduzierung der Makrophagenzahl um 83,2% bzw. 82,7% (Abb. 4.7, Abb. 4.8).

Zusammenfassend bestätigt die immunhistologische Auswertung die durchflusszytometrischen Daten einer tendenziell verminderten renalen T-Zellinfiltration unter AMG487-Behandlung im Vergleich zur Vehikelkontrolle. Im

Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe weisen sowohl FACS-Analyse als auch Immunhistologie eine deutlich reduzierte Makrophageninfiltration bereits unter Behandlung mit dem Vehikel nach, die durch zusätzliche Gabe des CXCR3-Antagonisten nicht mehr signifikant vermindert wird.

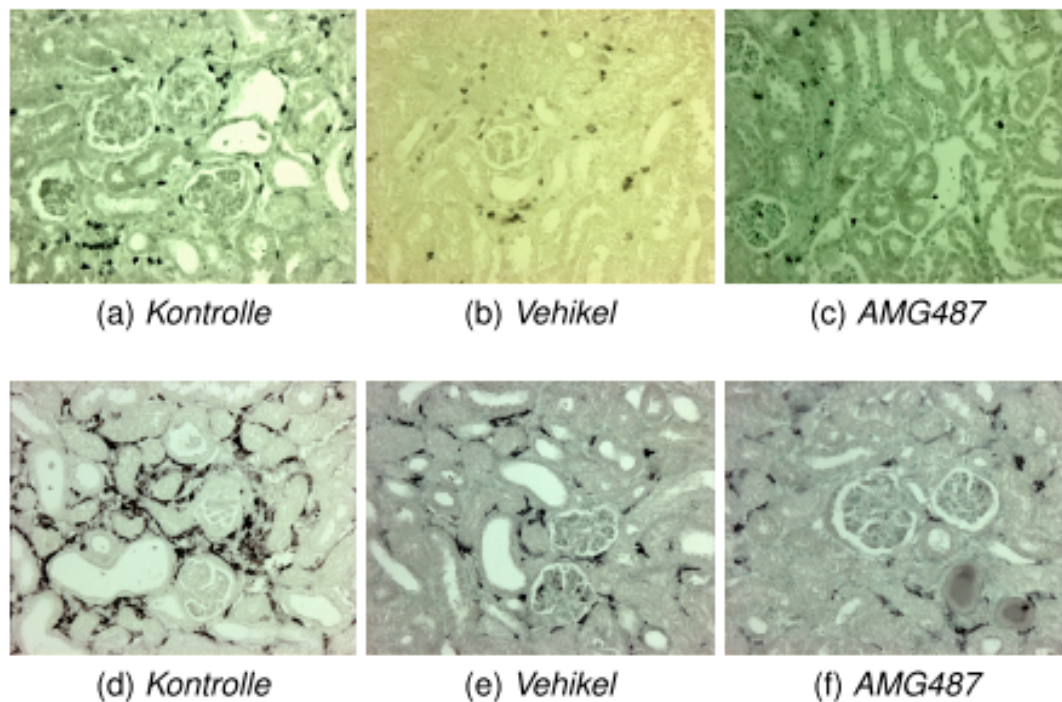


Abb. 4.7: Immunhistologische Färbung renaler CD3-positiver T-Zellen (a-c) und ER-HR3-positiver Makrophagen (d-f) am Tag 21 der nephrotoxischen Serumnephritis in unbehandelten nephritischen Kontrolltieren, Vehikel- und AMG487-behandelten Tieren (Originalvergrößerung x200).

*

*

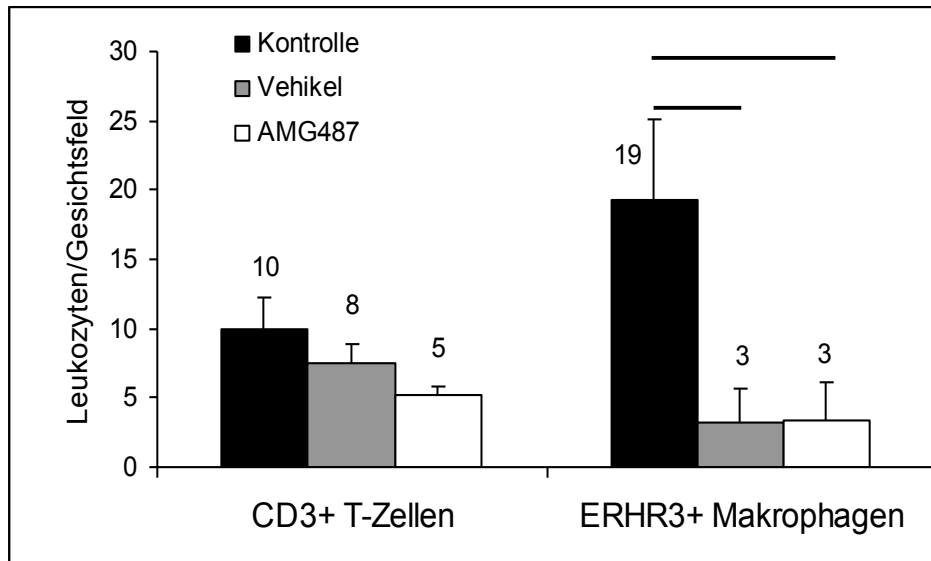


Abb. 4. 8: Immunhistologischer Nachweis CD3-positiver T-Zellen und ER-HR3-positiver Makrophagen im Nierenkortex am Tag 21 der nephrotoxischen Serumnephritis (* $p < 0.05$). Es wurden pro Tier zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder ausgezählt (Originalvergrößerung x400).

4.1.7 Nachweis von CXCR3-positiven Zellen im Blut und in der Niere

Um einen möglichen Effekt des CXCR3-Antagonisten AMG487 auf die renale Infiltration CXCR3-positiver T-Zellen im Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis zu erfassen, wurden durchflusszytometrisch CXCR3-positive CD4- und CD8-Zellen im peripheren Blut und im renalen Leukozyteninfiltrat untersucht (Abb. 4.9).

Diese Färbung wurde vergleichend für die Vehikelgruppe und die AMG487-behandelte Tiergruppe durchgeführt (Abb. 4.10).

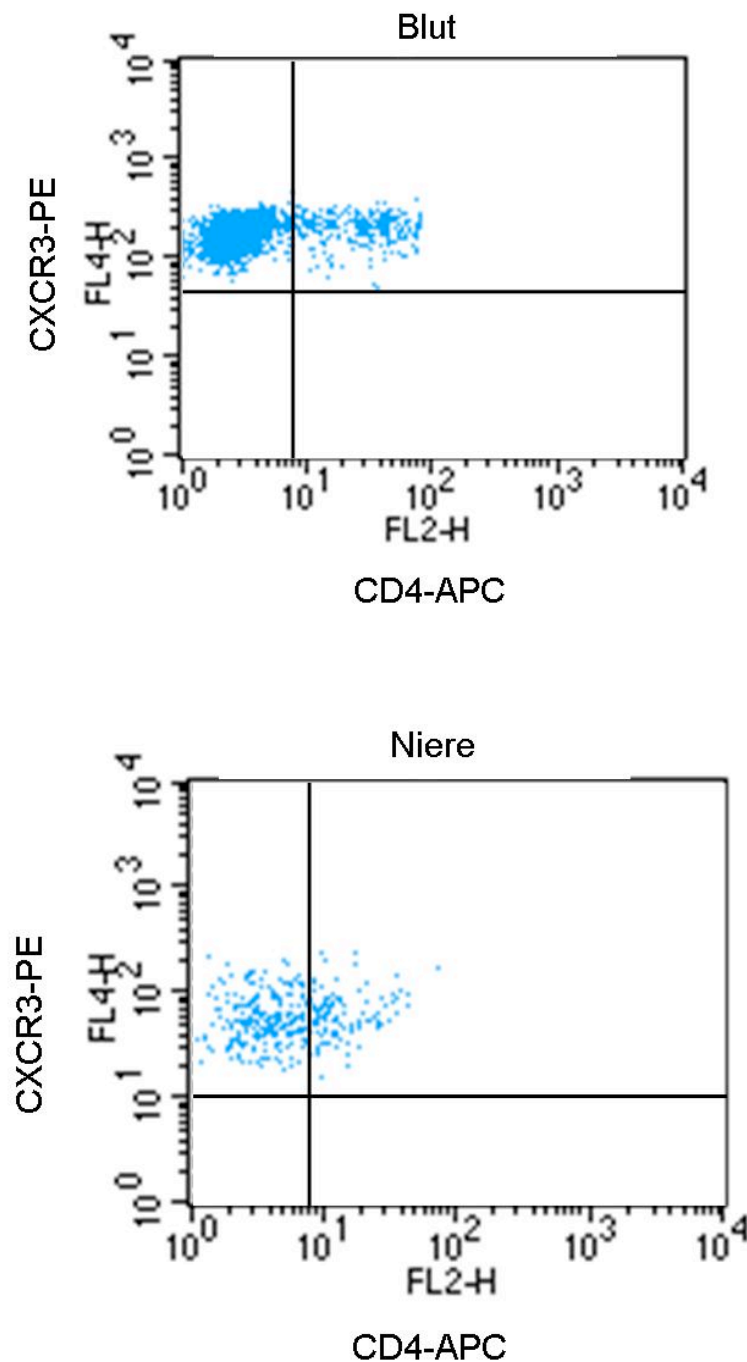


Abb. 4.9: Durchflusszytometrische Detektion CXCR3 positiver T-Zellen in Blut und Niere. Beispielhaft sind Dot Blots für CD4 T-Zellen dargestellt.

Wie in Abbildung 4.10 dargestellt sind sowohl in Vehikel- als auch AMG487-behandelten Mäusen am Tag 21 im peripheren Blut etwa 7% bis 8% der CD4 T-Zellen CXCR3 positiv, gegenüber 36% der CD8 T-Zellen. Im renalen Leukozyteninfiltrat tritt eine Akkumulation CXCR3-positiver CD4 T-Zellen auf, die bis zu

22% bis 27% CXCR3 an der Oberfläche exprimieren. Die Behandlung mit AMG487 bewirkte jedoch keine Veränderungen des CXCR3-positiven T-Zellanteils im Blut und in der Niere (Abb. 4.10).

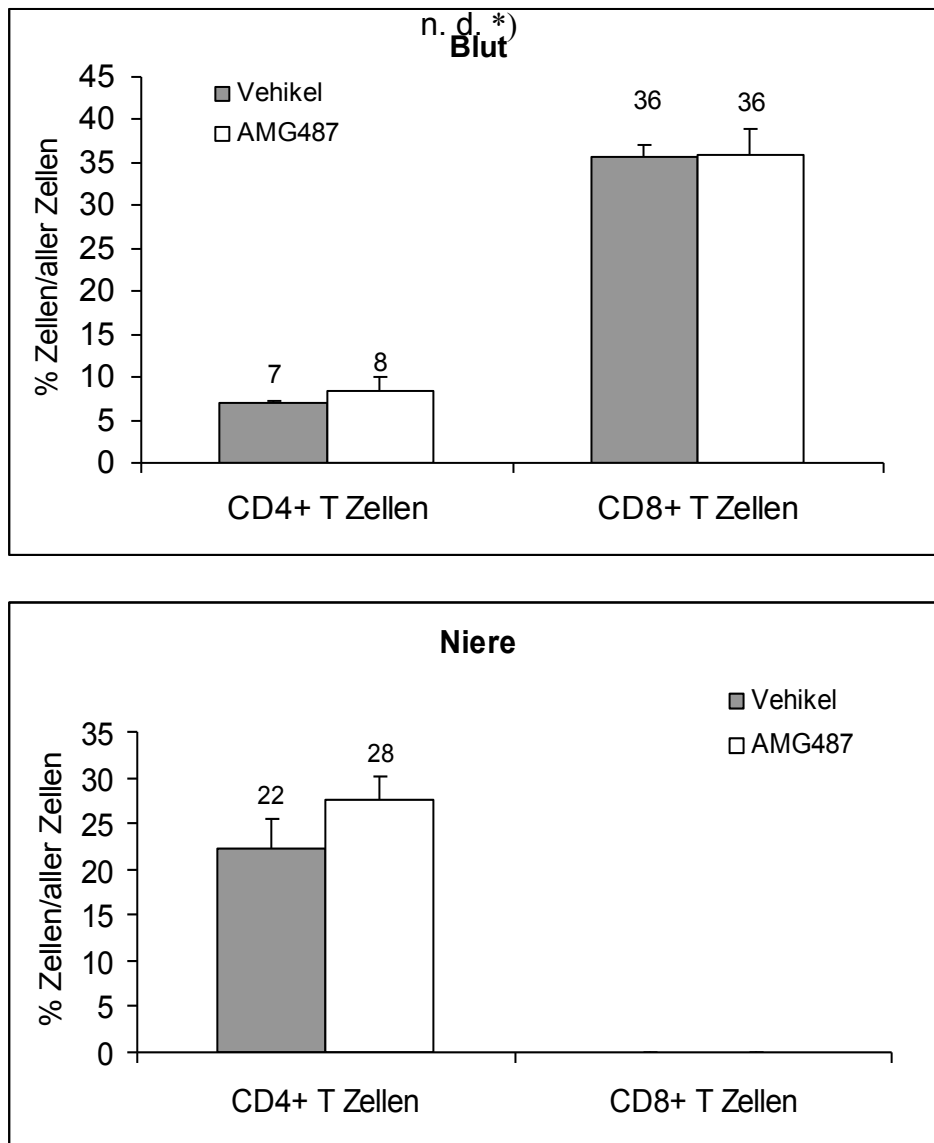


Abb. 4.10: Prozentualer Anteil CXCR3-positiver Zellen an der jeweiligen Zellpopulation im Blut und in der Niere.

*) Die Analyse renaler CD8 T-Zellen konnte im vorliegenden Experiment nicht durchgeführt werden.

4.2 Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis unter oraler Gabe des CXCR3-Antagonisten AMG487

Unter subkutaner Gabe des CXCR3-Antagonisten AMG487 im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis konnte gezeigt werden, dass eine AMG487-Behandlung gegenüber Vehikel-behandelten Mäusen tendenziell, jedoch nicht signifikant die glomeruläre Matrixdeposition und renale Leukozyteninfiltration reduziert. Allerdings fiel auf, dass im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrolle bereits die Behandlung mit der Vehikellösung Cyclodextrin eine deutliche, zum Teil signifikante Verbesserung der funktionellen Parameter (Serumharnstoff, Cholesterin), der glomerulären Matrixdeposition und der renalen Leukozyteninfiltration bewirkte.

Um die Verbesserung des Krankheitsverlaufs bereits durch alleinige Gabe des Vehikels Cyclodextrin zu umgehen, wurde eine zweite Versuchsreihe mit oraler Applikation von AMG487 unter Verwendung der alternativen Vehikellösung Methylcellulose durchgeführt.

4.2.1 Nierenfunktion und nephrotisches Syndrom

Aus dem am Tag 21 gewonnenen Serum wurden Kreatinin und Harnstoff als Maß der exkretorischen Nierenfunktion bestimmt. In allen drei Versuchsgruppen waren diese Werte im Rahmen der nephrotoxischen Serumnephritis im Vergleich zu nicht behandelten nicht nephritischen Mäusen (Strichlinie in Abb. 4.11) erhöht. Die Kreatininwerte der AMG487-behandelten Mäuse waren vergleichbar mit den Werten der Vehikelkontrolle. Im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe sah man sowohl bei den Vehikel-behandelten Mäusen wie auch bei den AMG487-behandelten Mäusen eine signifikante Senkung des Kreatininwertes (jeweils um 37,7%). Die AMG487-behandelten Mäuse zeigten im Vergleich zur Vehikelkontrolle eine geringe, aber nicht signifikante Tendenz zu erniedrigten Harnstoffwerten. Die Harnstoffwerte der Vehikel-behandelten Mäuse, wie auch verstärkt der AMG487-behandelten Mäuse, waren im Vergleich zu den Harnstoffwerten der unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe tendenziell, jedoch nicht signifikant vermindert.

Alle Tiere zeigten laborchemisch ein nephrotisches Syndrom mit Hypoproteinämie und Hypercholesterinämie.

Die AMG487-behandelten Tiere wiesen im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren eine signifikant (16,3%) verminderte Hypoproteinämie auf. Auch verglichen mit den unbehandelten nephritischen Kontrolltieren war die Hypoproteinämie der CXCR3-blockierten Mäuse tendenziell weniger stark ausgeprägt. Im Vergleich zur Vehikelkontrolle zeigten die AMG487-behandelten Mäuse keine signifikant unterschiedlichen Cholesterinwerte. Verglichen mit den unbehandelten nephritischen Kontrollmäusen sah man bei den AMG487-behandelten Mäusen eine tendenzielle, bei den Vehikel-behandelten Mäusen eine signifikante Verbesserung (31,0%) des Serumcholesterins (Abb. 4.11).

Diese Ergebnisse sprachen im Vergleich zu unbehandelten nephritischen Kontrolltieren für tendenziell verbesserte funktionelle Parameter sowohl bei Vehikel- als auch bei AMG487-behandelten Mäusen, ohne zusätzlich spezifischen Effekt der AMG487-Behandlung im Vergleich zur Vehikelgruppe.

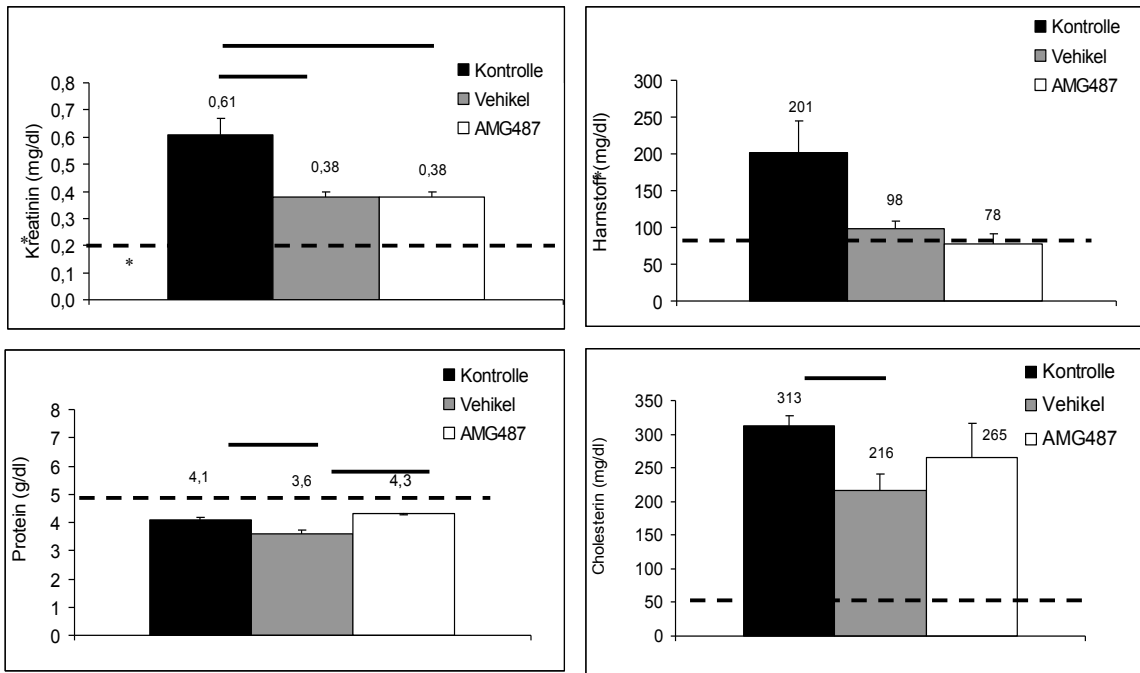


Abb. 4.11: Serumwerte der Interventionsstudie mit oraler Gabe des CXCR3-Antagonisten. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Kreatininwerte und eine tendenzielle Verbesserung der Harnstoffwerte in der Vehikel- und AMG487-behandelten Gruppe im Vergleich zur nicht behandelten Gruppe. Die Hypoproteinämie war bei den CXCR3-behandelten Mäusen am geringsten ausgeprägt. Im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Mäusen kam es zu einer signifikant verringerten, verglichen mit den unbehandelten Mäusen zu einer tendenziell verringerten Hypoproteinämie. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren zeigten die AMG487-behandelten Tiere tendenziell verbesserte, die Vehikel-behandelten Tiere signifikant verbesserte Cholesterinwerte (* $p < 0,05$). Die gestrichelte Linie gibt die gemessenen Durchschnittswerte von unbehandelten Wildtypmäusen an.

4.2.2 Proteinurie

Auch in dieser Versuchreihe wurden wöchentlich Urinproben gesammelt und diese mittels Stix auf Proteingehalt getestet. Wie in Abb. 4.12 dargestellt, zeigt sich in den mit AMG487-behandelten Mäusen im Vergleich zur nichtbehandelten Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung der Proteinurie bereits am Tag 14. Am Tag 21 zeigt sich eine signifikante Verbesserung der AMG487-behandelten Mäuse im Vergleich zu den Vehikel-behandelten und zu den unbehandelten nephritischen Kontrollmäusen.

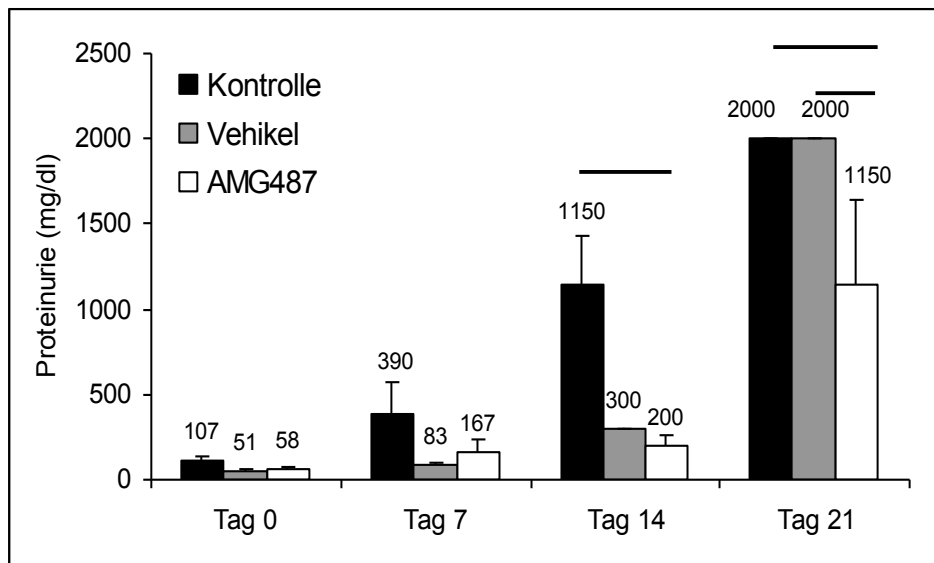


Abb. 4.12: Wöchentlicher Verlauf der Proteinurie (* $p < 0.05$).

4.2.3 Nachweis autologer anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper

Zur Prüfung, ob die orale Behandlung mit AMG487 die systemische Immunantwort im Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis beeinflusst, wurden die Titer der gebildeten autologen anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper im Serum mittels ELISA bestimmt. Die Mäuse aller Versuchsgruppen entwickelten deutliche Antikörperspiegel. In allen Verdünnungen waren die Titer aller drei Versuchsgruppen nahezu identisch (Abb. 4.13).

Diese Ergebnisse belegten eine intakte systemische Immunantwort auch in Mäusen, die mit dem CXCR3-Antagonisten behandelt wurden.

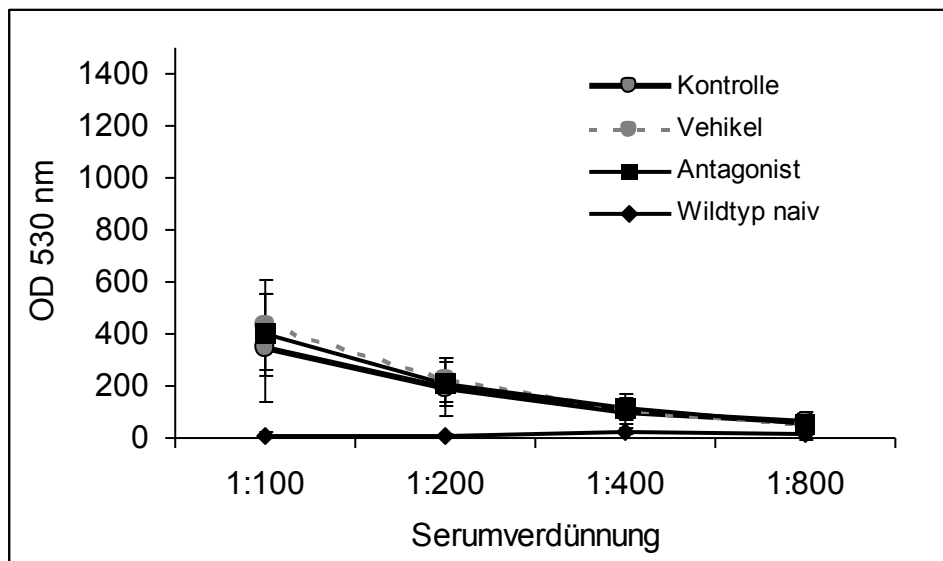


Abb. 4.13: Nachweis autologer anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper. Die Antikörper wurden am Tag 21 nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis mittels ELISA gemessen. Die Titerwerte der Verdünnungsstufen sind in arbiträren Einheiten angegeben.

4.2.4 Glomerulosklerose

Die semiquantitative morphometrische Auswertung der glomerulären PAS-positiven Matrixablagerung zeigte eine deutliche glomeruläre Deposition PAS-positiven Materials in den unbehandelten nephritischen Kontrolltieren (Abb.4.14). Die glomerulären Matrixablagerungen der AMG487-behandelten Tiere waren vergleichbar mit denen der Vehikel-behandelten Tiere. Im Vergleich von AMG487- und Vehikel-behandelter Versuchsgruppe zur unbehandelten nephritischen Gruppe zeigte sich allerdings eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Reduktion der glomerulären PAS-positiven Ablagerungen (Abb. 4.15).

Diese tendenzielle Reduktion der glomerulären PAS-positiven Ablagerungen bei den AMG487-behandelten Mäusen sowie den Vehikel-behandelten Mäusen korreliert mit den verbesserten funktionellen Parametern in beiden Versuchsgruppen.

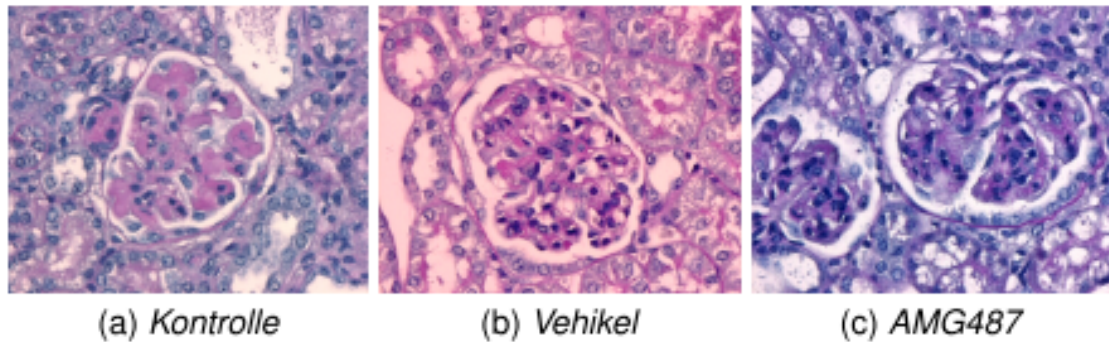


Abb. 4.14: PAS-positive glomeruläre Ablagerungen in unbehandelten nephritischen Kontrolltieren, Vehikel- und AMG487-behandelten Tieren am Tag 21 der nephrotoxischen Serumnephritis. Dargestellt sind repräsentative Glomeruli jeder Versuchsgruppe. PAS-Färbung, (Originalvergrößerung x400).

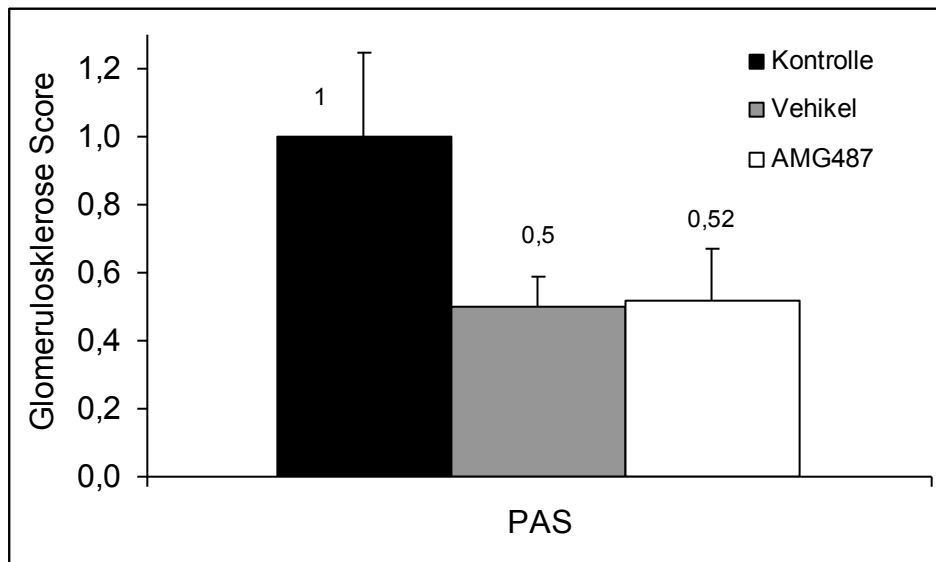


Abb. 4.15: Semiquantitative Auswertung der glomerulären PAS-Ablagerungen am Tag 21. Im Vergleich zu unbehandelten nephritischen Kontrolltieren kam es sowohl in der Vehikelgruppe als auch in der AMG487-behandelten Gruppe zu einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Reduktion der PAS-positiven Ablagerungen in Glomeruli.

4.2.5 Durchflusszytometrische Quantifizierung des renalen Leukozyteninfiltrats

Zur Quantifizierung des Leukozyteninfiltrats in nephritischen Nieren wurde in Einzelzellsuspensionen der Gesamtnieren der relative Anteil CD45-positiver Leuko-

zyten, CD4- und CD8-positiver T-Zellen sowie F4/80-positiver Makrophagen durchflusszytometrisch ermittelt.

Die Zahl infiltrierender CD45-positiver Leukozyten war in allen drei Versuchgruppen nahezu identisch.

Auch bei der Quantifizierung infiltrierender CD4 T-Zellen gab es zwischen den drei Gruppen keine Unterschiede. Die CD8 T-Zellzahlen waren in AMG487-behandelten Tieren im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe nicht signifikant verschieden. Im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe zeigten die Vehikel-behandelten, nicht jedoch die AMG487-behandelten Tiere, eine signifikant erhöhte Zahl CD8-positiver T-Zellen. Die Zahl renaler F4/80-positiver Makrophagen unter AMG487-Behandlung im Vergleich zur Vehikelkontrolle und zur nichtbehandelten nephritischen Kontrollgruppe (Abb. 4.16).

Zusammenfassend zeigt die durchflusszytometrische Quantifizierung des renalen Leukozyteninfiltrats somit sowohl im Vergleich zur Vehikelgruppe als auch zur unbehandelten nephritischen Gruppe keinen signifikanten Effekt der oralen AMG487-Gabe auf die renale Leukozyteninfiltration in nephritischen Nieren.

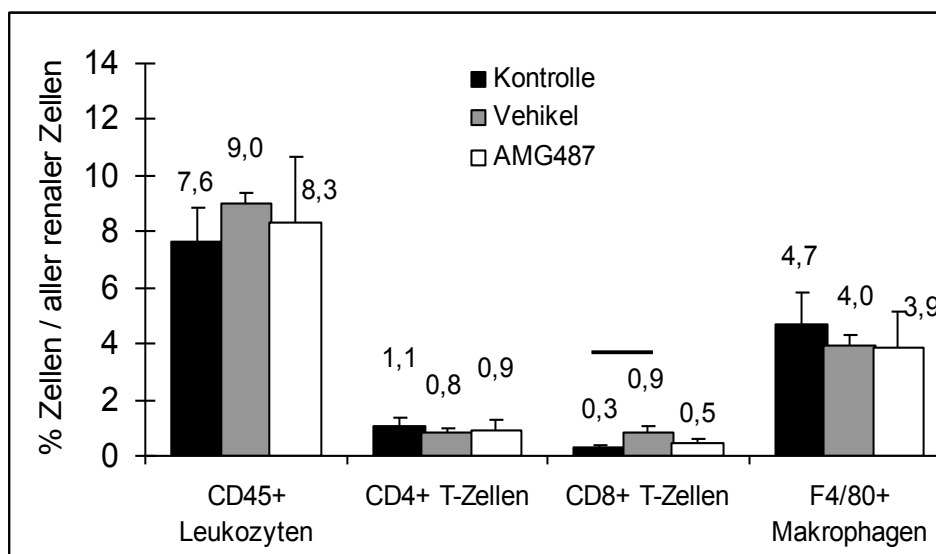


Abb. 4.16: Durchflusszytometrische Quantifizierung des renalen Leukozyteninfiltrats an Tag 21 der nephrotoxischen Serumnephritis (* $p < 0.05$).

4.2.6 Immunhistologischer Nachweis des renalen Leukozyteninfiltrats

Ergänzend zur durchflusszytometrischen Quantifizierung des renalen Leukozyteninfiltrats erfolgte noch die immunhistologische Untersuchung der renalen Leu-

kozyteninfiltration in den renalen Kortex am Tag 21. Wie in Abb. 4.17 deutlich wird, erfolgte in der unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe die Einwanderung CD3-positiver T-Lymphozyten und ER-HR3-positiver Makrophagen hauptsächlich in das Interstitium, ein glomeruläres Leukozyteninfiltrat war nicht prominent.

Im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren, war die renale Infiltration CD3-positiver T-Zellen bei den mit AMG487-behandelten Mäusen tendenziell, jedoch nicht signifikant reduziert. Das CD3-positive T-Zellinfiltrat in der Vehikelgruppe und der unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe war dagegen identisch (Abb. 4.18). Das Ausmaß der Makrophageninfiltration war in AMG487-behandelten und Vehikel-behandelten Mäusen dagegen gleich, in beiden Gruppen gegenüber der unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe jedoch tendenziell um 74,8% bzw. 76,4% vermindert (Abb. 4.18).

Zusammenfassend bestätigen die immunhistologischen Daten der renalen T-Zellinfiltration nicht die durchflusszytometrischen Daten. Immunhistologisch zeigte sich eine tendenziell erniedrigte T-Zellinfiltration unter AMG487-Behandlung, die durchflusszytometrisch nicht beobachtet wurde. Im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe weisen dagegen Immunhistologie, nicht jedoch die Durchflusszytometrie, eine deutlich reduzierte Makrophageninfiltration bereits unter Behandlung mit dem Vehikel auf, die durch zusätzliche Gabe des CXCR3-Antagonisten nicht mehr signifikant vermindert wird. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der immunhistologischen Auswertung sind möglicherweise durch die Erfassung aller renaler Leukozyten in der Durchflusszytometrie, jedoch nur der kortikalen Zellen in der Immunhistologie, begründet.

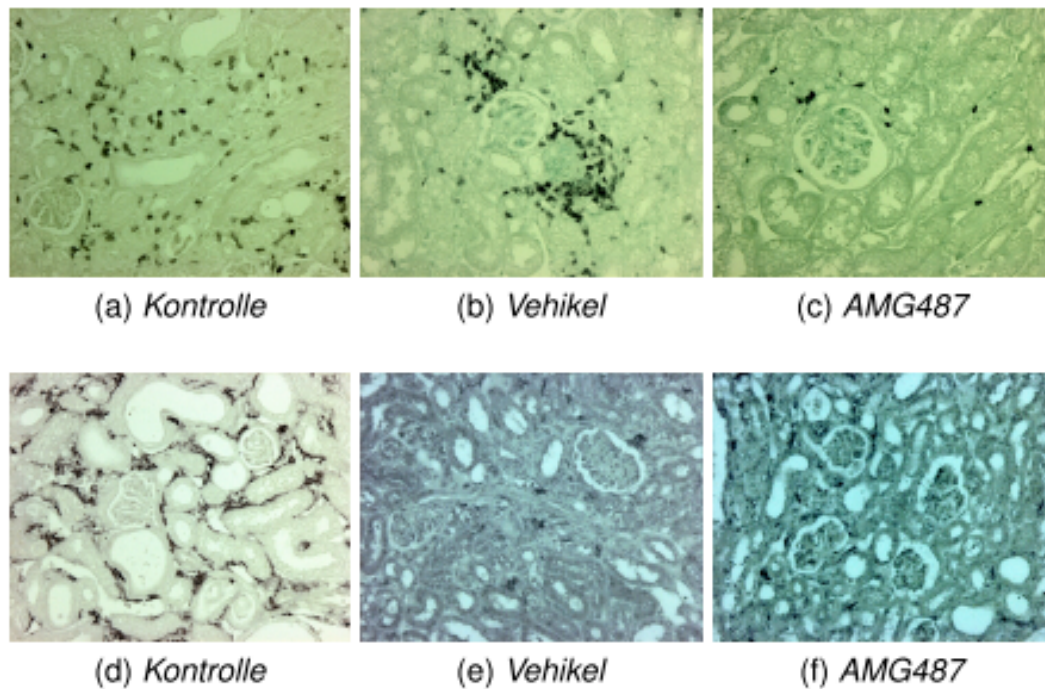


Abb. 4.17: Immunhistologische Färbung renaler CD3-positiver T-Zellen (a-c) und ER-HR3-positiver Makrophagen (d-f) am Tag 21 der nephrotoxischen Serumnephritis in unbehandelten nephritischen Kontrolltieren, Vehikel- und AMG487-behandelten Tieren (Originalvergrößerung x200).

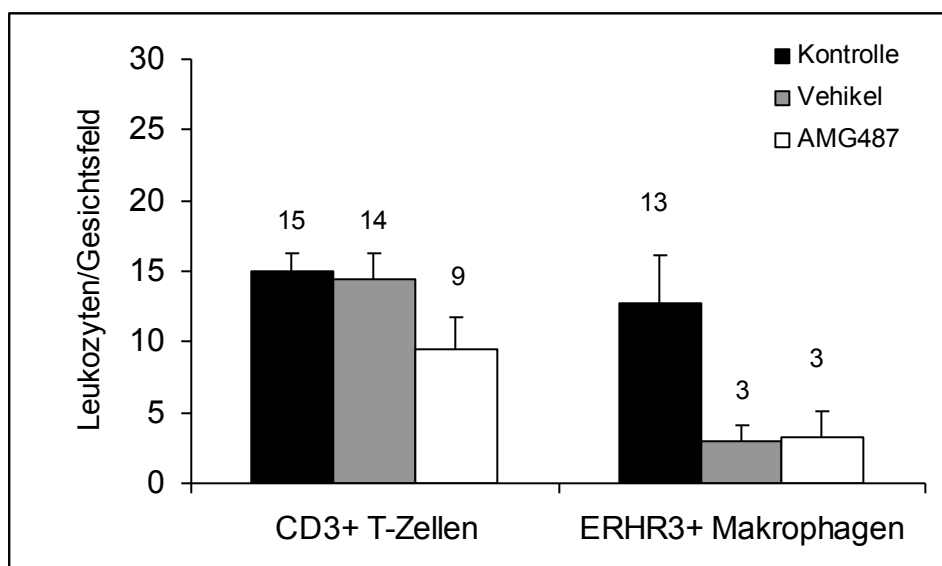


Abb. 4.18: Immunhistologischer Nachweis CD3-positiver T-Zellen und ER-HR3-positiver Makrophagen im Nierenkortex am Tag 21 der nephrotoxischen Serumnephritis. Es wurden pro Tier zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder ausgezählt (Originalvergrößerung x400).

4.2.7 Nachweis von CXCR3-positiven Zellen im Blut und in der Niere

Um einen möglichen Effekt des CXCR3-Antagonisten AMG487 auf die renale Infiltration CXCR3-positiver T-Zellen im Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis zu erfassen, wurden durchflusszytometrisch CXCR3-positive CD4- und CD8- Zellen im peripheren Blut und im renalen Leukozyteninfiltrat untersucht. Die Färbung wurde vergleichend für die Vehikelgruppe und die AMG487-behandelten Tiergruppe durchgeführt.

Wie in Abbildung 4.19 dargestellt, gab es zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Am Tag 21 der nephrotoxischen Serumnephritis sind im peripheren Blut ca. 9% der CD4 T-Zellen und ca. 35% der CD8 T-Zellen CXCR3 positiv. Im renalen Leukozyteninfiltrat sind 20 bis 24% der CD4 T-Zellen und 20 bis 22% der CD8 T-Zellen CXCR3 positiv. Die Behandlung mit AMG487 ergab somit keine Veränderung des CXCR3-positiven Zellanteils in Blut und Niere (Abb.4.19).

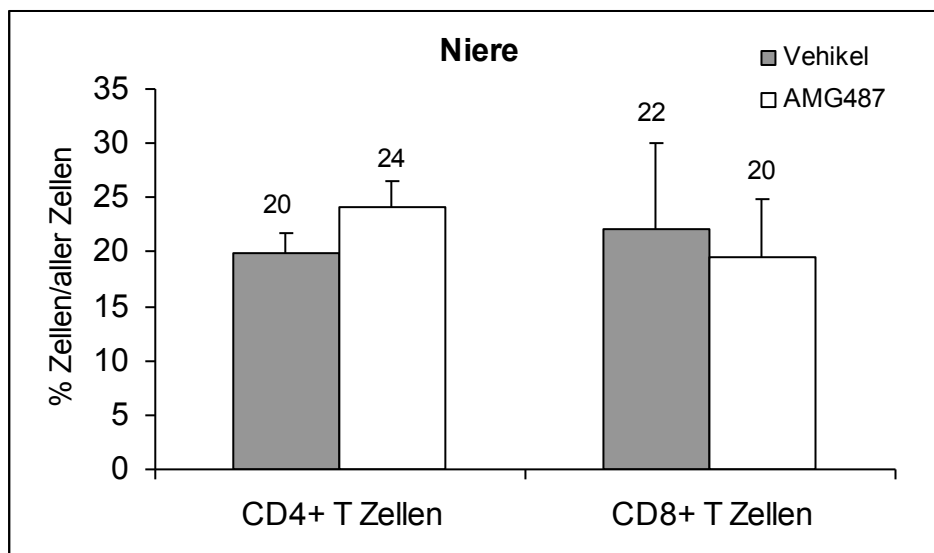
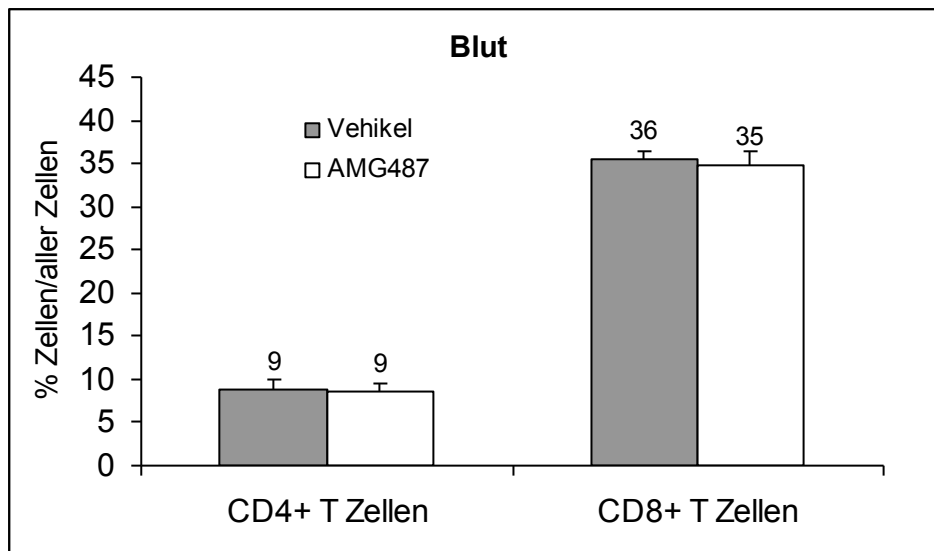


Abb. 4.19: Prozentualer Anteil CXCR3-positiver Zellen an der jeweiligen Zellpopulation in der Niere und im Blut.

5 Diskussion

5.1 Funktionelle Rolle des Chemokinrezeptors CXCR3 bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis

Die funktionelle Rolle von CXCR3 bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis wurde in einer Studie von Panzer et. al. (44) mit CXCR3-Knockout Mäusen beschrieben. Diese Studie war, aufgrund ihrer erfolgversprechenden Daten, die Grundlage für die hier vorliegende Arbeit, in der erstmalig im Modell der Immunkomplex-Glomerulonephritis die CXCR3 Blockade mit dem CXCR3-Antagonisten AMG487 untersucht wurde. Anhand dieser Arbeit von Panzer et. al.(44) soll nun die funktionelle Rolle des Chemokinrezeptors CXCR3 im Modell der Immunkomplex-Glomerulonephritis erläutert werden.

Der Chemokinrezeptor CXCR3 wird hauptsächlich von Th1-T-Zellen exprimiert (44). Aus einer Studie (52), in der renale Biopsien von Patienten mit Immunkomplex-Glomerulonephritiden untersucht wurden, ist bekannt, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 hauptsächlich von tubulointerstitiellen T-Zellen exprimiert wird (52). In der oben genannten Arbeit von Panzer et. al. (44) war die renale Expression des CXCR3-Rezeptors erst 7 Tage nach Induktion der Immunkomplex-Glomerulonephritis in der Gruppe der nephritischen Wildtypmäuse im Vergleich zu der Gruppe der Kontrollmäuse signifikant erhöht. In der Gruppe der CXCR3-Knockout-Mäuse war zu keinem Zeitpunkt eine CXCR3-Expression nachweisbar (44). Am Tag 14 der nephrotoxischen Serumnephritis waren Serumkreatinin- und Harnstoffwerte als Maß der exkretorischen Nierenfunktion bei den CXCR3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den CXCR3^{+/+}-Mäusen signifikant erniedrigt (44). Eine signifikant verminderte Albuminurie der CXCR3-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den nephritischen Wildtypmäusen war am Tag 7 und 14 zu beobachten (44). Die PAS-positiven Ablagerungen, als Zeichen zunehmender glomerulärer Matrixablagerung und Sklerose, waren am Tag 14 bei den CXCR3-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den nephritischen Wildtypmäusen signifikant erniedrigt (44). Zur Quantifizierung der renalen T-Zellinfiltration wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Am Tag 14 wurde in den nephritischen Wildtypmäusen eine 1,7-fach erhöhte renale T-Zellinfiltration im Vergleich zu den CXCR3-Knockout-Mäusen festgestellt (44). Dieses Ergebnis wurde durch die immunhis-

tologische Untersuchung der renalen CD3-Infiltration bestätigt: in den CXCR3^{-/-}-Mäusen ließ sich am Tag 7 und Tag 14 im Vergleich zu den CXCR3^{+/+}-Mäusen eine signifikant verminderte tubulointerstitielle T-Zellinfiltration nachweisen. Auch die glomeruläre T-Zellinfiltration war in der Gruppe der CXCR3-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den nephritischen Wildtypmäusen signifikant erniedrigt. Allerdings waren insgesamt nur sehr wenig glomeruläre T-Zellen nachweisbar (44). Zur Analyse der renalen Makrophageninfiltration wurden zwei immunhistologische Färbungen durchgeführt: F4/80 zur Quantifizierung tubulointerstitieller und MAC-2 zur Quantifizierung glomerulärer Makrophagen. Sowohl die tubulointerstitielle wie auch die glomeruläre Makrophageninfiltration waren am Tag 7 und Tag 14 nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis in beiden Versuchsgruppen (CXCR3^{-/-}- und CXCR3^{+/+}-Mäusen) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Im Vergleich zu den nephritischen Wildtypmäusen ließ sich in den CXCR3-Knockout-Mäusen eine tendenzielle, jedoch nicht signifikant verminderte tubulointerstitielle Infiltration von Makrophagen erkennen (44). Sowohl in nephritischen Wildtyp- als auch CXCR3^{-/-}-Mäusen konnte eine intakte systemische Immunantwort nachgewiesen werden, d.h. die Spiegel zirkulierender Antikörper gegen das injizierte nephrotoxische Serum und die IFN- γ -Produktion von restimulierten Splenozyten war in beiden Gruppen vergleichbar (44). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Verbesserung der Serumnephritis in CXCR3-defizienten Mäusen tatsächlich auf einer verminderten Infiltration CXCR3-positiver T-Effektorzellen in die Niere beruht und nicht auf einer ineffektiven systemischen humoralen oder zellulären Immunantwort in CXCR3^{-/-}-Mäusen (44).

Die hier beschriebenen Vordaten zeigen, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis an der renalen T-Zellinfiltration und dem darauf folgenden renalen Gewebeschaden beteiligt ist. Somit könnte die pharmakologische Blockade von CXCR3 in Zukunft eine therapeutische Option zur Behandlung der Th-1 vermittelten Glomerulonephritis sein. In der vorliegenden Arbeit wurden daher erstmals mögliche therapeutische Effekte einer pharmakologischen CXCR3-Blockade mit einem kleinmolekularen Rezeptorantagonisten im Mausmodell der nephrotoxischen Serumnephritis untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien sind in den nachfolgenden Kapiteln diskutiert.

5.2 Pharmakologische Blockade von CXCR3 mit dem kleinmolekularen Antagonisten AMG487 in der Maus

Die CXCR3-Expression wurde bereits auf verschiedenen Malignomzellen, wie z.B. Melanomzellen (57), Brust- und Prostatakarzinomzellen (58, 59) sowie Neuroblastomzellen (60) beschrieben. CXCR3 scheint an der Regulation der Zellproliferation und des Zellüberlebens von Malignomzellen beteiligt zu sein (57). So sind CXCR3-Liganden wie Mig in der Lage, verschiedenen Signalwege, die mit der Zellmobilität sowie der Modulation der Zellproliferation assoziiert sind, zu aktivieren (57). Die Expression von CXCR3 scheint an der Tumorgenese beteiligt zu sein. Somit wurden bereits einige tierexperimentelle Studien mit dem CXCR3-Antagonisten AMG487 zu onkologischen Fragestellungen durchgeführt.

In einer Studie von Walser et. al. (28) wurde der Effekt des CXCR3-Antagonisten AMG487 auf das Wachstum von Lungenmetastasen beim metastasierten Mammakarzinom im Mausmodell untersucht (28). Nach Vorbehandlung von Mammakarzinomzellen mit AMG487 (200nmol/L und 1µmol/L) bzw. dem Vehikel wurden diese den Mäusen intravenös injiziert. Nach 21 Tagen wurden die Lungen der Mäuse untersucht. Die Tumorzellen, die mit der höheren Dosis AMG487 behandelt worden waren, entwickelten im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Mäusen signifikant weniger Lungenmetastasen (28). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der systemische Effekt von AMG487 im gleichen Modell untersucht. Nach intravenöser Injektion von Mammakarzinomzellen erfolgte von Tag -1 bis Tag 7 zweimal täglich die subkutane Gabe von AMG487 in einer Dosierung von 5mg/kg Körpergewicht bzw. die subkutane Gabe des Vehikels (20%-iges Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin). Am Tag 21 erfolgte die Untersuchung der Lungen. Die AMG487 behandelten Mäuse hatten im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Mäusen signifikant weniger Lungenmetastasen entwickelt (113 vs. 171) (28). Aus dieser Studie geht hervor, dass die Blockade von CXCR3 im Modell des metastasierten Mammakarzinoms die Bildung von Lungenmetastasen hemmt, aber auf das lokale Tumorwachstum keinen Einfluss hat. Dies könnte mit der vermehrten Expression der CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 in der Lunge zusammenhängen. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit dem CXCR3-Antagonisten natürliche Killerzellen (NK) beansprucht: bei NK-Knockout-Mäusen war die antimetastatische Wirkung von AMG487 verloren.

CXCR3 scheint im Tumormodell an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt zu sein (28).

In einer Studie von Pradelli et. al. (45), konnte durch die Blockade des Chemokinrezeptors CXCR3 mit dem Chemokinrezeptorantagonisten AMG487 die Lungenmetastasierung von Osteosarkomzellen im Mausmodell vermindert werden (45). Am Tag 0 erfolgte die intravenöse Injektion von murinen Osteosarkomzellen in die Schwanzvene. Von Tag 5 bis Tag 12 erfolgte zweimal täglich die subkutane Gabe vom AMG487 in einer Konzentration von 5mg/kg Körpergewicht und vom Vehikel (20%-iges Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin) (45). Am Tag 15 erfolgte die Untersuchung der Lungen. Bei den AMG487-behandelten Mäusen war im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Mäusen eine Reduktion der Anzahl der sichtbaren Tumorknoten auf der Pleura um 47% nachzuweisen. In der histopathologischen Aufarbeitung zeigten sich weniger und kleinere Tumorherde in den AMG487-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Mäusen (45). Um die Beteiligung von CXCR3 im Frühstadium der Metastasenbildung zu untersuchen, wurden murine Osteosarkomzellen *in vitro* mit AMG487 vorbehandelt. Zur Verstärkung der CXCR3-Blockade erfolgte zweimal täglich die subkutane Gabe von AMG487 in einer Dosierung von 5mg/kg Körpergewicht am Tag -1 bis Tag +3. 15 Tage nach Injektion der murinen Osteosarkomzellen entwickelten die AMG487-behandelten Mäuse im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Mäusen 40% weniger Lungenmetastasen (45).

Ebenfalls konnte im Mausmodell des pulmonal metastasierten Kolonkarzinoms durch die Behandlung mit AMG487 die Zahl der sichtbaren pleuralen Tumorknoten im Vergleich zur Vehikelbehandlung reduziert werden sowie die Tumorgroße verringert werden (55). In diesem Modell wurde ebenfalls die Dosierung von 5mg/kg Körpergewicht, gelöst in 20%igen Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin, gewählt (55). AMG487 bzw. der Vehikel wurden zweimal täglich subkutan injiziert (55).

Im Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis wurde durch Applikation des CXCR3-Antagonisten AMG487 bis zu einer Dosis von 50mg/kg Körpergewicht eine Reduktion der Entzündungsreaktion sowie des Knorpelschadens beobachtet (29).

Für die hier vorliegende Arbeit wurde die Dosis von 10mg/kg Körpergewicht AMG487, gelöst in 20%igen beta-Cyclodextrin, gewählt. Zusätzlich wurden Stu-

dien mit oraler Gabe mit einer Konzentration von 30mg/kg Körpergewicht, gelöst in 1%iger Methycellulose, durchgeführt. Diese Dosierung wurde auf Empfehlung der Firma Amgen gewählt, da hierzu keine veröffentlichten Referenzdaten existieren.

Als Modell wurde das der Immunkomplex-Glomerulonephritis gewählt, aus dem die erfolgversprechenden publizierten Daten (44) mit den CXCR3-Knockout-Mäusen stammen (siehe Kapitel 5.1).

5.3 Effekte der subkutanen und oralen CXCR3-Blockade mit AMG487 im Modell der Immunkomplex-Glomerulonephritis

Unter subkutaner Gabe des CXCR3-Antagonisten AMG487 waren, im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren, die Serumkreatininwerte tendenziell, jedoch nicht signifikant erniedrigt. Die Serumharnstoffwerte waren vergleichbar. Ebenso wurden in diesen beiden Gruppen nahezu identische Serumproteinwerte sowie Serumcholesterinwerte gemessen. Am Tag 14 war eine tendenziell und am Tag 21 eine signifikant reduzierte Proteinurie der AMG487-behandelten Tiere im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren zu beobachten. Die AMG487-Behandlung verbesserte somit die Proteinurie als funktionellen Parameter der glomerulären Schädigung, während weitere Serumparameter eines nephrotischen Syndroms nicht und die exkretorische Nierenfunktion nur tendenziell günstig beeinflusst wurden. Im Vergleich der AMG487-behandelten Versuchsgruppe mit der Vehikelgruppe ergab sich eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Verminderung der PAS-positiven Ablagerungen in den Glomeruli als Ausdruck der Matrixexpansion und Glomerulosklerose. Die durchflusszytometrische Auswertung ergab eine tendenziell verminderte renale T-Zell- und Makrophageninfiltration der AMG487-behandelten Mäuse im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Mäusen. Diese Daten decken sich mit der immunhistologischen Auswertung: im Vergleich dieser beiden Gruppen kam es zu einer tendenziell verminderten renalen T-Zellinfiltration bei AMG487-behandelten Mäusen, die Makrophageninfiltration war allerdings identisch. Trotz der tendenziell verminderten renalen T-Zellinfiltration unter AMG487-Behandlung konnte im Vergleich zur Vehikelgruppe durchflusszytometrisch keine Veränderung im relativen Anteil

CXCR3-positiver T-Zellen im peripheren Blut oder im Nierengewebe nephritischer Tiere nachgewiesen werden. Die AMG487-Behandlung scheint daher die Gesamtzahl renal infiltrierender T-Zellen zu reduzieren, ohne den relativen Anteil CXCR3-positiver Zellen zu vermindern. Die systemische Immunreaktion gegenüber dem applizierten nephrotoxischen Kaninchen-Serum scheint durch AMG487 nicht beeinflusst zu sein, da die Serumspiegel autologer Kaninchenantikörper als Maß für die humorale Immunantwort in allen untersuchten nephritischen Versuchsgruppen vergleichbar waren. Zusammenfassend wurde somit durch die subkutane AMG487-Behandlung im Vergleich zur Vehikelgruppe eine signifikante Reduktion der Proteinurie erreicht, was mit einer tendenziell geringeren glomerulären Vernarbung einherging. Zusätzlich zeigten sich eine tendenzielle Verbesserung der exkretorischen Nierenfunktion und eine tendenziell reduzierte Infiltration renaler Leukozyten in AMG487-behandelten Tieren. Die intakte Immunantwort unter AMG487-Behandlung spricht gegen systemische immunsuppressive Effekte des Antagonisten, sondern für eine Beeinflussung der renalen, CXCR3-abhängigen T-Zellinfiltration als Ursache des verbesserten Krankheitsverlaufs bei AMG487-behandelten Tieren.

Wie beschrieben hatte allerdings bereits die subkutane Gabe der Vehikellösung Cyclodextrin gegenüber der unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe deutliche positive Effekte auf den Krankheitsverlauf gezeigt (vgl. auch Punkt 5.4). Eine zusätzliche signifikante Verbesserung der Nephritis durch die subkutane AMG487-Behandlung im Vergleich zur Vehikelgruppe konnte daher bei zahlreichen funktionellen und histologischen Parametern nicht mehr gezeigt werden. Die tendenzielle, wenn auch nicht signifikante Verbesserung zahlreicher Endpunktparameter unterstützt jedoch die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese, dass durch pharmakologische Blockade von CXCR3 die entzündliche Aktivität und Nierenschädigung bei einer Immunkomplex-Glomerulonephritis verbessert werden kann.

Aufgrund des unerwarteten Effekts der subkutanen β -Cyclodextringabe auf den Krankheitsverlauf wurde zur Untersuchung spezifischer AMG487-Effekte eine zweite Versuchsreihe durchgeführt. Es wurde unter Verwendung der alternativen Vehikellösung, 1% Methylcellulose, der CXCR3-Antagonist AMG487 in einer Konzentration von 30mg/kg Körpergewicht zweimal täglich oral appliziert. Hier

waren die Kreatininwerte der AMG487-behandelten Mäuse vergleichbar mit den Werten der Vehikelkontrolle. Die Harnstoffwerte der AMG487-behandelten Mäuse waren im Vergleich zur Vehikelkontrolle gering, aber nicht signifikant erniedrigt. Die Hypalbuminämie als Parameter des nephrotischen Syndroms zeigte sich in AMG487-behandelten Tieren im Vergleich zur Vehikelgruppe signifikant verbessert, die Hypercholesterinämie war in beiden Gruppen jedoch nicht signifikant verschieden. Die Proteinurie war in AMG487-behandelten Tieren am Tag 21 im Vergleich zur Vehikelkontrolle signifikant reduziert. Die glomerulären PAS-positiven Matrixablagerungen waren in beiden Gruppen vergleichbar. Auch die durchflusszytometrische Quantifizierung des renalen Leukozyteninfiltrats ergab unter oraler AMG487-Behandlung eine mit der Vehikelgruppe vergleichbare T-Zell- und Makrophageninfiltration. Bei der immunhistologischen Auswertung war die renale Infiltration CD3-positiver T-Zellen bei mit AMG487-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren tendenziell, jedoch nicht signifikant reduziert. Das Ausmaß der Makrophageninfiltration fiel in diesen beiden Gruppen identisch aus. Wie in der Versuchsserie mit subkutaner Gabe, zeigten sich durchflusszytometrisch durch die orale AMG487-Behandlung keine Veränderungen im Anteil CXCR3-positiver T-Zellen im peripheren Blut oder in erkrankten Nieren. Auch die humorale Immunantwort war bei vergleichbaren auto-logen Antikörperspiegeln in allen untersuchten Versuchsgruppen intakt. Insgesamt ergab sich somit in dieser Versuchsreihe ein geringer therapeutischer Effekt der oralen AMG487-Gabe im Vergleich zur Vehikelgruppe auf funktionelle Parameter, histologische Schädigung und renale Leukozyteninfiltration. Allerdings zeigte sich im Vergleich von Vehikelgruppe (orale Gabe von 1%-iger Methylcellulose) und unbehandelten nephritischen Kontrollen eine deutliche, zum Teil signifikante Verbesserung einzelner funktioneller und histologischer Parameter in der Vehikelgruppe (vgl. auch Punkt 5.5).

Zusammengefasst bewirkte die orale AMG487-Behandlung vergleichbar zur subkutanen CXCR3-Blockade an Tag 21 eine Reduktion der Proteinurie, zusätzlich auch eine geringere Hypalbuminämie. Auch ergaben sich unter oraler Gabe ähnlich wie nach subkutaner AMG487-Behandlung Hinweise auf eine tendenziell verbesserte exkretorische Nierenfunktion und verminderte T-Zellinfiltration in der Immunhistologie, jedoch nicht in der Durchflusszytometrie. Effekte auf das Ausmaß der Glomerulosklerose oder die renale Makrophageninfiltration konnten un-

ter oraler Therapie dagegen nicht nachgewiesen werden, waren aber unter subkutaner CXCR3-Blockade zumindest tendenziell vorhanden.

Sowohl in der Versuchserie mit subkutaner als auch mit oraler AMG487-Applikation zeigten sich bereits unter alleiniger Vehikelgabe therapeutische Effekte im Vergleich zu einer nicht behandelten nephritischen Kontrollgruppe. Durch diese methodische Problematik ist aus den vorliegenden Daten das tatsächliche therapeutische Potential der CXCR3-Blockade mit AMG487 im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis nicht abschließend zu beurteilen. Die zumindest tendenzielle Verbesserung zahlreicher funktioneller und histologischer Parameter, insbesondere unter subkutaner AMG487-Behandlung, weist jedoch auf therapeutische Effekte einer CXCR3-Blockade mit einem kleinmolekularen Antagonisten im Tiermodell einer Immunkomplex-Glomerulonephritis hin.

5.4 Effekte der subkutanen Vehikelbehandlung mit β -Cyclodextrin im Modell der Immunkomplex-Glomerulonephritis

Die Serumkreatininwerte der Vehikelgruppe waren im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe nur geringfügig vermindert, die Serumharnstoffwerte waren tendenziell, jedoch nicht signifikant reduziert. Die Serumproteinwerte der Vehikel-behandelten Mäuse waren vergleichbar mit denen der nephritischen Kontrollmäuse. Dagegen kam es im Vergleich zu unbehandelten Mäusen in der Vehikel-behandelten Gruppe zu einer signifikanten Abschwächung der Hypercholesterinämie. Es konnte eine tendenzielle Reduzierung der Proteinurie am Tag 14 der Vehikelgruppe im Vergleich zur nichtbehandelten Kontrollgruppe beobachtet werden. Am Tag 21 zeigte dagegen die subkutane Vehikelbehandlung mit Cyclodextrin im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe keinen Effekt. Allerdings war in der Vehikelgruppe eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Reduktion der glomerulären PAS-positiven Ablagerungen zu beobachten. In der durchflusszytometrischen Untersuchung ergab sich eine tendenzielle Reduktion der infiltrierenden CD4 und CD8 T-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten nephritischen Kontrolltieren. Die Vehikel-Behandlung führte sogar zu einer signifikanten Reduktion der infiltrierenden Makrophagen im Vergleich zur nephritischen Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse wur-

den durch die immunhistologische Auswertung bestätigt. Hier war ebenfalls eine tendenzielle Reduktion der renalen T-Zellinfiltration sowie eine signifikante Reduktion der renalen Makrophageninfiltration der Vehikel-behandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten nephritischen Kontrolltieren zu beobachten. Hinweise auf eine durch Cyclodextrin veränderte systemische Immunantwort ergaben sich dagegen bei vergleichbaren autologen Antikörperspiegeln mit der nephritischen Kontrollgruppe nicht.

Diese Ergebnisse sprechen für eine eigenständige immunmodulatorische Wirkung des Vehikels (20%-iges Cyclodextrin) auf die lokale Entzündungsreaktion in der Niere. Aus der Untersuchung geht hervor, dass im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrolle bereits die Behandlung mit der Vehikellösung Cyclodextrin eine deutliche, zum Teil signifikante Verbesserung der funktionellen Parameter (Serumharnstoff, Cholesterin), der glomerulären Matrixdeposition und der renalen Leukozyteninfiltration bewirkte. 2004 erfolgte im Modell der Adriamycin-induzierten Nephropathie die Blockade des CCR1-Rezeptors mit dem CCR1-Antagonisten BX471 (43). Dieser wurde ebenfalls in Cyclodextrin gelöst (43). Es wurden wie in der vorliegenden Arbeit jeweils 50µl Cyclodextrin, allerdings in höherer Konzentration (40%), subkutan appliziert (43). Somit erhielten die Tiere sogar eine höhere Konzentration der Trägersubstanz. In den Untersuchungen der funktionellen Parameter, der Glomerulosklerose sowie der renalen Leukozyteninfiltration konnte in dieser Arbeit jedoch kein immunmodulatorischer Effekt durch Cyclodextrin selbst beobachtet werden (43).

Es existiert eine Studie von Walser et al. (28) in der ebenfalls der CXCR3-Antagonist AMG487 in Cyclodextrin gelöst und dann sowohl systemisch wie auch in Tumorzellen direkt injiziert wurde. Hier nahm der Vehikel insbesondere auf die T-Zellen keinen Einfluss (28). In einer weiteren Studie von Pradelli und Mitarbeitern (45) wurden durch Blockierung von CXCR3 mit AMG487 die Lungenmetastasen eines Osteosarkoms vermindert (45). Auch in diesen Studien wird die bei uns festgestellte immunmodulatorische Wirkung von Cyclodextrin nicht nachgewiesen. Diese Arbeiten sind jedoch aufgrund der verschiedenen Fragestellungen mit der hier vorliegenden Arbeit nicht zu vergleichen. Möglicherweise moduliert Cyclodextrin im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis die

lokale

T-Zellantwort in der Niere und verringert so insbesondere die interstitielle Schädigung.

Um die Verbesserung des Krankheitsverlaufs bereits durch alleinige Gabe des Vehikels Cyclodextrin zu umgehen, wurde eine zweite Versuchreihe mit oraler Applikation von AMG487 unter Verwendung der alternativen Vehikellösung Methylcellulose durchgeführt.

5.5 Effekte der oralen Vehikelbehandlung mit 1%-iger Methylcellulose im Modell der Immunkomplex-Glomerulonephritis

In der zweiten Versuchreihe wurde der CXCR3-Antagonist AMG487 in 1%-iger Methylcellulose gelöst. Es erfolgte die orale Gabe in einer erhöhten Konzentration von 30mg/kg Körpergewicht zweimal am Tag. Hierunter kam es bei den Vehikel-behandelten Mäusen zu einer signifikanten Reduktion des Serumkreatininwertes und zu einer tendenziellen Reduktion des Serumharnstoffwertes im Vergleich zu den unbehandelten nephritischen Kontrolltieren am Tag 21 der Serumnephritis. Die Behandlung mit 1%-iger Methylcellulose führte verglichen mit der nephritischen Kontrollgruppe einerseits zu einer signifikant stärkeren Hypoproteinämie, aber auch zu einer signifikant verminderten Hypercholesterinämie. Wöchentliche Messungen der Proteinurie ergaben von Tag 0 bis Tag 14 eine tendenzielle Verbesserung der Vehikel-behandelten Tiere im Vergleich zu den nephritischen Kontrolltieren. Am Tag 21 lag dagegen eine vergleichbare Proteinurie vor. Unter der Behandlung mit Methylcellulose kam es zu einer tendenziellen Reduktion der glomerulären PAS-positiven Matrixablagerungen. Die durchflusszytometrisch gemessene renale Infiltration von CD45-positiven Leukozyten, CD4-positiven T-Zellen und F4/80-positiver Makrophagen war in beiden Gruppen vergleichbar. Im Vergleich zur unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe zeigten die Vehikel-behandelten Tiere eine signifikant erhöhte Zahl CD8-positiver T-Zellen. Immunhistologisch war das CD3-positive T-Zellinfiltrat in der Vehikelgruppe und der unbehandelten nephritischen Kontrollgruppe identisch. Das Ausmaß der Makrophageninfiltration war in der Vehikelgruppe verglichen mit der nephritischen Kontrollgruppe dagegen tendenziell vermindert. Wie nach subkutaner Cyclodextringabe wurden die autologen Antikörperspiegel durch die Me-

thylcellulosebehandlung nicht beeinflusst, so dass von einer intakten systemischen Immunantwort auch in der Vehikelgruppe auszugehen ist.

Diese Ergebnisse zeigen ähnlich wie in der ersten Versuchsreihe, in der 20%-iges Cyclodextrin als Vehikel zur subkutanen Applikation verwendet wurde, einen deutlichen Einfluss der alleinigen oralen Methylcellulosegabe auf den Verlauf der Serumnephritis, mit zum Teil signifikanter Verbesserung einzelner funktioneller und morphologischer Parameter.

In beiden Versuchreihen sind deutliche, zum Teil sogar signifikante Vehikeleffekte im Sinne einer Verbesserung der Serumnephritis aufgetreten. Hierdurch wird die Erfassung von zusätzlichen therapeutischen Effekten des CXCR3-Antagonisten AMG487 eingeschränkt. In dieser Arbeit wurden zwei Vehikel mit einer unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung verwendet. Unter beiden trat der Vehikeleffekt auf. Somit wäre es denkbar, dass dies nicht abhängig von der chemischen Zusammensetzung der Vehikel ist, sondern z.B. durch den Stress, dem die Mäuse durch die zweifache tägliche Applikation (subkutan bzw. oral) ausgesetzt sind, entsteht. Allerdings wäre hier eher eine Verschlechterung als eine Verbesserung durch die Vehikelgabe zu erwarten. In Studien mit onkologischen Fragestellungen wurde AMG487 nach gleichem Protokoll subkutan injiziert (28, 45, 55). Hier konnte der Vehikeleffekt nicht beobachtet werden. Trotzdem wären zur Vermeidung der verwendeten Vehikellösungen und der täglichen Manipulationen weitere Applikationsarten zu diskutieren. Zum Beispiel wäre die Gabe von AMG487 in einer Futterbeimischung eine Option. Hier wäre allerdings die Varianz der Dosierung ein mögliches Problem. Eine weitere Applikationsart stellt die osmotische Minipumpe dar. Diese wird einmalig in einer kurzen Narkose implantiert und gibt dann die Substanz kontinuierlich ab, wobei allerdings auch hier die Lösung der Substanz in einem Vehikel erforderlich ist. Hiermit könnte man den Mäusen den täglichen Stress der zweimaligen subkutanen oder oralen Gabe von AMG487 ersparen.

5.6 Glomeruläre und interstitielle Effekte der CXCR3 Blockade

In beiden Versuchsreihen konnte im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren unter AMG487-Gabe am Tag 21 eine signifikante Abnahme der Proteinurie

gezeigt werden. Ebenfalls kam es in der subkutan AMG487-behandelten Gruppe im Vergleich zur Vehikelgruppe zu einer tendenziellen Reduktion der PAS-positiven Ablagerungen in den Glomeruli. Diese Daten sprechen für eine direkte Beeinflussung der glomerulären Schädigung durch AMG487 im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis, die möglicherweise unabhängig von einer reduzierten renalen T-Zellinfiltration ist.

Aus einer früheren Studie (49) geht hervor, dass CXCR3 im gesunden Nierengewebe nur diffus und spärlich auf den Podozyten exprimiert wird (49). Im Rahmen einer Entzündung, hier im Falle der membranösen Nephropathie, kommt es zu einer Expressioninduktion verschiedener CXC-Rezeptoren unter anderem auch von CXCR3 (49). In einer weiteren Studie (50) wurde die Bedeutung von IP-10, einem CXCR3-Liganden im Rahmen einer Thy1.1-Glomerulonephritis untersucht. Auch die Expression von IP-10 wird bei entzündlicher Schädigung induziert und ist ähnlich wie die Expression von CXCR3 auf Podozyten nachweisbar (50). Durch die Behandlung mit monoklonalen anti-IP-10 Antikörpern wurde die Expression von IP-10 und von Podozyten-assoziierten Proteinen, die verantwortlich für die Podozytenfunktion sind, vermindert (50). Dies ging mit einem Podozytenschaden einher, der sich in einer verstärkten Proteinurie äußerte (50). Im Modell der Thy1.1-Glomerulonephritis scheint daher eine CXCR3-Aktivierung durch IP-10 protektiv zu wirken und einer entzündlichen glomerulären Schädigung entgegen zu wirken. In einer weiteren Studie konnte belegt werden, dass anti-IP-10 Antikörper durch Störung der Zellzyklusbalance einen Podozytenschaden verschlimmern (48). In Widerspruch zu diesen Ergebnissen konnten in der hier vorgelegten Arbeit durch Blockade von CXCR3 glomeruläre Schäden eher verhindert werden. Möglicherweise spielt bei Immunkomplexnephritiden weniger ein Podozyten-stabilisierender Effekt durch IP-10 vermittelte CXCR3-Aktivierung eine Rolle, als proinflammatorische Effekte einer CXCR3-Aktivierung durch alternative Chemokinliganden. Tatsächlich konnten in IP-10-defizienten Mäusen im Modell einer Immunkomplex-vermittelten Lupusnephritis keine Veränderung des Krankheitsverlaufs nachgewiesen werden (46). In der gleichen Studie wurden allerdings auch CXCR3- und CXCL9-defiziente Mäuse im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis untersucht. Neben IP-10 ist auch CXCL9/Mig ein Chemokin, dass CXCR3 aktiviert. In beiden Genotypen kam es zu einer Reduktion der Glomerulosklerose, Verbesserung der Nierenfunktion und zu einer geringeren

renalen T-Zell Infiltration (46). Diese Ergebnisse belegen wie die Untersuchungen von Panzer et al. in CXCR3-defizienten Mäusen (44) und den eigenen Ergebnissen der CXCR3-Blockade eine proinflammatorische Rolle von CXCR3 im Verlauf der Serumnephritis. Alternativ zu IP-10 könnte allerdings vorrangig der CXCR3-Ligand CXCL9/Mig die proinflammatorischen CXCR3-Effekte bei der nephrotoxischen Serumnephritis und der Lupusnephritis vermitteln (46). Interessanterweise konnte auch nachgewiesen werden, dass die beiden CXCR3-Liganden IP-10 und CXCL9/Mig an der Proliferation von Mesangiumzellen im Rahmen der Glomerulonephritis beteiligt sind (51). Diese These wird durch die hier vorliegende Arbeit unterstützt, da das Ausmaß des glomerulären Schadens bei den AMG487-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren tendenziell reduziert war.

Die durchflusszytometrische und immunhistologische Auswertung ergab eine tendenziell verminderte renale T-Zellinfiltration unter subkutaner AMG487-Behandlung. Histologisch zeigte sich in allen Versuchsgruppen vorwiegend eine interstitielle Einwanderung CD3-positiver T-Lymphozyten, ein glomeruläres T-Zellinfiltrat war kaum nachweisbar. Die AMG487-Behandlung hat somit vorrangig Effekte auf die interstitielle T-Zellinfiltration. Dies wird durch Daten einer humanen Biopsiestudie von Segerer und Mitarbeitern (52) unterstützt, die die CXCR3-Expression in Nierenbiopsien von Patienten mit IgA-Nephropathie, Lupus Nephritis und membranöser-proliferativer Glomerulonephritis untersucht. Die CXCR3-positiven Zellen konzentrierten sich auf das Interstitium, glomeruläre CXCR3-positive Zellen waren kaum nachweisbar (52). Die in der vorliegenden Arbeit reduzierte renale T-Zellinfiltration unter CXCR3-Blockade mit AMG487 deckt sich mit den Ergebnissen der Vordaten. In der Studie von Panzer et al. wurde die nephrotoxische Serumnephritis in CXCR3-defizienten Mäusen induziert (44). Neben einer verminderten Proteinurie und der Reduktion glomeruläre PAS-positiver Ablagerungen konnte eine verbesserte Nierenfunktion und eine reduzierte renale T-Zellinfiltration beobachtet werden (44). Ähnliche Effekte zeigen Menke und Mitarbeiter (46), wie schon oben beschrieben, im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis ebenfalls in CXCR3-defizienten Mäusen, wobei hier zusätzlich CXCL9- und CXCL10-defiziente Mäuse untersucht wurden. Interessanterweise konnte sowohl bei den CXCR3- wie auch den CXCL9-defizienten Mäusen eine Verbesserung der Erkrankung, das heißt eine verbesserte Nierenfunktion sowie

eine verminderte renale T-Zellinfiltration beobachtet werden (46). Die vorliegenden Daten bestätigen, dass CXCR3 an der renalen T-Zellinfiltration beteiligt ist. Die in allen Arbeiten nur partiell nachgewiesene Reduktion der T-Zellinfiltration spricht für eine Beteiligung weiterer Chemokine/Chemokinrezeptoren an der T-Zell Rekrutierung. So konnte durch die pharmakologische Blockade des Chemokinrezeptors CCR1 im Modell der Lupus Nephritis ebenfalls eine Verbesserung der funktionellen Parameter und eine verminderte interstitielle T-Zell- und Makrophageninfiltration erreicht werden (43).

5.7 Schlussfolgerung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die erstmalige pharmakologische Blockade des Chemokinrezeptors CXCR3 mit dem Chemokinrezeptorantagonisten AMG487 im Mausmodell einer Immunkomplex-Glomerulonephritis eine Verbesserung der funktionellen Parameter, des glomerulären Schadens sowie eine Reduzierung der renalen T-Zell- und Makrophageninfiltration zu erreichen. Bereits durch die Gabe des Vehikels selbst zeigte sich jedoch überraschenderweise eine Verbesserung in zahlreichen untersuchten Parametern. Darüberhinaus konnten nur wenige signifikante, spezifische Effekte durch die Behandlung von AMG487 erreicht werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Blockade des CXCR3-Rezeptors mit subkutan verabreichtem AMG487 im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis zu einer Verbesserung der Proteinurie und zu tendenziell verbesserten funktionellen Parametern, Glomerulosklerose und renaler Leukozyteninfiltration führt. Auch eine zweite Versuchsreihe mit oraler Applikation von AMG487, das hierdurch in der alternativen Vehikellösung Methylcellulose gelöst werden konnte, zeigte bei alleiniger Gabe des Vehikel im Vergleich zu den unbehandelten nephritischen Kontrolltieren eine tendenzielle Verbesserung vor allem pathologischer Veränderungen, ohne dass unter oraler Gabe von AMG487 im Vergleich zu der Vehikelgruppe deutliche zusätzliche therapeutische Effekte erreicht werden konnten, mit Ausnahme der Proteinurie am Tag 21. Zusammen mit den Vordaten, die in CXCR3-defizienten Knockout-Mäusen übereinstimmend eine Verbesserung der nephrotoxischen Serumnephritis beschreiben (44, 46), weisen die hier erarbeiteten Daten einer zumindest tendenziell verbesserten Serumnephritis unter subkutaner CXCR3-Blockade auf das

therapeutische Potential einer pharmakologischen Blockade von CXCR3 hin. Durch eine CXCR3-blockierende Behandlung könnte die entzündliche Aktivität und Nierenschädigung bei einer Immunkomplex-Glomerulonephritis verbessert werden. Untersuchungen zur pharmakologischen Blockade des Chemokinrezeptors CXCR3 in Tiermodellen einer Immunkomplex-Glomerulonephritis sollten daher weiter verfolgt werden. Hierbei müssen alternative Applikationsformen des Antagonisten, beispielsweise unter Verwendung implantierter osmotischer Minipumpen, zur Anwendung kommen. Um das therapeutische Potential einer CXCR3-blockierenden Therapie mit dem kleinmolekularen Antagonisten AMG487 im Mausmodell der nephrotoxischen Serumnephritis abschließend zu untersuchen, ist in weiteren Experimenten in jedem Falle eine veränderte Galenik notwendig, um die dargestellten Effekte der Vehikellösungen auf den Verlauf der Erkrankung zu umgehen.

6 Abkürzungen und Begriffe

°C	Grad Celsius
6Ckine	Chemokine with 6 cysteines
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
AMAC	Alternative Macrophage Activation-Associated CC Chemokine
AOP	Amino-Oxypentane
APC	Allophycocyanin
APES	3-Aminopropyltriethoxy-Silan
BCA-1	B-cell Activating Chemokine-1
BLC	B Lymphocyte Chemoattractant
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca	Calcium
CCCK	CC Chemokine
CCR2	Chemokinrezeptor
CINC	Cytokine- Induced Neutrophil Chemoattractant
ck β	CC Chemokine
CRG	Cytokine-Responsive Gene
CXCR3	Chemokinrezeptor
CyC	CyChrome
dc/ β -ck-1	denritic cell β -chemokine-1
DC-CK-1	Dentritic Cell Chemokine 1
DSS	Dextran Sodium Sulfate
DPBS	Dulbecco`s PBS
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELC	Epstein-Barr virus-induced receptor Ligand Chemokine
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENA-78	Epithelial cell-derived Neutrophil Attractant
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanat

g	Erdschwerebeschleunigung
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GRO	Growth Related Oncogene
HAF	Horse Apoferritin
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCC	Hemofiltrate CC Chemokine
IgG	Immunglobulin G
IL-8	Interleukin 8
i.p.	intraperitoneal
IP-10	Interferon-inducible Protein
I-TAC	Interferon-inducible T cell α -Chemoattractant
i.v.	intravenous
kD	kilo Dalton
LMC	Lymphocyte and Monocyte Chemoattractant CC Chemokine
MCAF	Monocyte Chemoattractant and Activating Factor
MCIF	Macrophage Colony-Inhibitory Factor
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MDC	Macrophage-Derived Chemokine
MET	Methionylated
Mg	Magnesium
MGSA	Melanoma Growth-Stimulatory Activity
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeterquecksilbersäule
MPIF	Myeloid Progenitor Inhibitory Factor
MRP	MIP-Related Protein
NCC	Novel CC Chemokine
NSN	Nephrotoxische Serumnephritis

PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
pH	pondus Hydrogenii
PBSF	Pre-B cell-Stimulatory Factor
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
SDF-1	Stromal cell-Derived Factor-1
TARC	Thymus- and Activation-Related Chemokine
TECK	Thymus-Expressed Chemokine
TMB	Tetramethyl-Benzidine

7 Literaturverzeichnis

1. Quasi Niere 2006/2007
2. Rollins BJ: Chemokines. Blood 1997, 90: 909-928
3. Luster AD: Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 1998, 338:436-445
4. Vielhauer V, Eis V, Schlöndorff D, Anders HJ: Identifying chemokines as therapeutic targets in renal disease: Lessons from antagonist studies and knock out mice. Kidney blood press res. 2004, 27: 226-238
5. Zlotnik A, Yoshie O: Chemokines : A new classification system and their role in immunity. Immunity 2000, 12:121-127
6. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Herbert CA, Horuk R, Matushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power Ca: International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev 2000, 52:145-176
7. Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R, et al: Selectins: a family of adhesion receptors. Cell 1991, 67: 233
8. Ley K: Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. Cardiovasc Res 1996, 32: 733-742
9. Ley K. Arrest chemokines. Microcirculation 2003 Jun; 10(3-4):289-295
10. Campbell J, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC: Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. Science 1998, 279: 381-384
11. Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E: Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. Immunol Rev 2002, 186: 37-46
12. Luther SA, Cyster JG: Chemokines as regulators of T-Cell differentiation. Nat. Immunol 2001, 2: 102-107
13. Campbell DJ, Kim CH, Butcher EC: Chemokines in the systemic organization of immunity. Immunol Rev 2003, 195: 58-71
14. Keane MP, Strieter RM: The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis. Chem Immunol 1999; 72: 86-101

15. Salcedo R, Oppenheim JJ: Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation* 2003, 10: 359-370
16. Volker Vielhauer, Detleff Schlöndorff, Hans-Joachim Anders: Disease mechanism of glomerulonephritis: chemokines and chemokine receptors. *Drug discovery today* 2004: 83-90
17. Segerer S, Nelson PJ, Schlöndorff D: Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000, 11: 152-176
18. US Renal Data System: www.usrd.org
19. Schmidt, Thews, Lang: *Physiologie des Menschen* (2000), 737
20. Anders, H.J. et al: Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution progression of renal disease. *Kidney Int.* 2003, 63: 401-415
21. Anders HJ, Vielhauer V, Kretzler M, Cohen CD, Segerer S, Luckow B, Weller L, Gröne HJ, Schlöndorff D: Chemokine and chemokine receptor expression during initiation and resolution of immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001, 12: 919-931
22. Vielhauer V, Andres HJ, Mack M, Cihak J, Strutz F, Stangassinger M, Luckow B, Gröne HJ, Schlöndorff D: Obstructive nephropathy in the mouse: Progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor-2 and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol* 2001, 12: 1173-1187
23. Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR: Monocyte chemoattractant protein-1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Exp Med* 1999, 190: 1813-1824
24. Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlöndorff D: Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001, 12: 1369-1382
25. Anders HJ, Banas B, Linde Y, Weller L, Cohen CD, Kretzler M, Martin S, Vielhauer V, Schlöndorff D, Gröne HJ: Bacterial CpG-DNA aggravates im-

- immune complex glomerulonephritis: Role of TLR9-mediated expression of chemokines and chemokine receptors. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14: 317-326
26. Anders HJ, Vielhauer V, Eis V, Linde Y, Kretzler M, Pérez de Lema G, Strutz F, Bauer S, Rutz M, Wagner H, Gröne HJ, Schlöndorff D: Activation of toll like receptor-9 induces progression of renal disease in MRL(Fas)lpr mice. *Faseb J* 2004 Mar, 18(3): 534-536
 27. Hirotake Tokuyama, Satoshi Ueha, Makoto Kurachi, Kouji Matushima, Fuminori Moriyasu, Richard S. Blumberg, Kazuhiro Kakimi: The simultaneous blockade of chemokine receptors CCR2, CCR5, CXCR3 by a non-peptide chemokine receptor antagonist protects mice from dextran sodium sulphate-mediated colitis. *International Immunology* 2005, 17: 1023-1034
 28. Tonya C. Walser, Salah Rifat, Xinrong Ma, Namita Kundu, Chris Ward, Olga Goloubeva, Michael G. Johnson, Julio C. Medina, Tassie L. Collins, Amy M. Fulton: Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2006, 66: 7701-7707
 29. Maikel Wijtmans, Dennis Verzijl, Rob Leurs, Iwan J. P. de Esch, Martine J. Smit: Towards small-molecule CXCR3 ligands with clinical potential. *ChemMedChem* 2008, 3: 861-872
 30. Heck S et al, I κ B alpha independent downregulation of NF- κ B activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J* 1997, 16: 4698-4707
 31. Natori Y, Nishimura T, Yamabe H, Iyonaga K, Takeya M, Kawakami M: Production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured glomerular epithelial cells: inhibition by dexamethasone. *Exp. Nephrol.* 1997, 5: 318-322
 32. Ruiz-Ortega M, Roperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J: Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int. Suppl.* 2002, (82): 512-522
 33. Schmeisser A, Soehnlein O, Illmer T, Lorenz HM, Eskafi S, Roerick O, Gabler C, Strasser R, Daniel WG, Garlachs CD: ACE inhibition lowers angiotensin II-induced chemokine expression by reduction of NF- κ B activity and AT1 receptor expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 325: 532-540

34. Shimizu S, Nakashima H, Masutani K, Inoue Y, Miyake K, Akahoshi M, Tanaka Y, Egashira K, Hirakata H, Otsuka T, Harada M: Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates nephritis in MRL/lpr mice. *Rheumatology* 2004, 43: 1121-1128
35. Brühl H, Cihak J, Stangassinger M, Shlöndorff D, Mack M: Depletion of CCR5-expressing cells with bispecific antibodies and chemokine toxins: a new strategy in the treatment of chronic inflammatory diseases and HIV. *J Immunol.* 2001, 166: 2420-2426
36. Chen S, Bacon KB, Li L, Garcia GE, Xia Y, Lo D, Thompson DA, Siani MA, Yamamoto T, Harrison JK, Feng L: In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. *J Exp Med.* 1998, 188: 193-198
37. Gong JH, Clark-Lewis I: Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH2-terminal residues. *J Exp Med.* 1995, 181: 631-640
38. Proudfoot AE, Power CA, Hoogwerf AJ, Montjovent MO, Borlat F, Offord RE, Wells TN: Extension of recombinant human RANTES by the retention of initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem* 1996, 271: 2599-2603
39. Simmons G, Clapham PR, Picrd L, Offord RE, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Buser R, Wells TN, Proudfoot AE: Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 1997, 276: 276-279
40. Panzer U, Schneider A, Wilken J, Thompson DA, Kent SB, Stahl RA: The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1999, 56: 2107-2115
41. Anders HJ, Vielhauer V, Frink M, Linde Y, Cohen CD, Blattner SM, Kretzler M, Strutz F, Mack M, Gröne HJ, Onuffer J, Horuk R, Nelson PJ, Schlöndorff D: A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J Clin Invest* 2002, 109: 251-259
42. Anders HJ, Belemzova E, Eis V, Segerer S, Vielhauer V, Perez de Lema G, Kretzler M, Cohen CD, Frink M, Horuk R, Hudkins KL, Alpers CE, Mampaso

- F, Schlöndorff D: Late onset of treatment with a chemokine receptor CCR1 antagonist prevents progression of lupus nephritis in MRL-Fas(lpr) mice. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15: 1504-1513
43. Vielhauer V, Berning E, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, Horuk R, Gröne HJ, Schlöndorff D, Anders HJ: CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2004, 66: 2264-2278
 44. Panzer U, Steinmetz OM, Paust HJ, Meyer-Schwesinger C, Peters A, Turner JE, Zahner G, Heymann F, Kurts C, Hopfer H, Helmchen U, Haag F, Schneider A, Stahl RA: Chemokine receptor CXCR3 mediates T cell recruitment and tissue injury in nephrotoxic nephritis in mice. *J Am Soc Nephrol* 2007, 18: 2071- 2084
 45. Emmanuelle Pradelli, Babou Karimjee-Soilihi, Jean-François Michiels, Jean-Ehrland Ricci, Marie-Ange Millet, Fanny Vandenbos, Timothy J. Sullivan, Tassie L. Collins, Michael G. Johnson, Julio C. Medina, Eugenie S. Kleinerman, Annie Schmid-Alliana, and Heidy Schmid-Antomarchi: Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs. *Int J Cancer* 2009, 125: 2586-2594
 46. Julia Menke, Geraldine C. Zeller, Eriya Kikawada, Terry K. Means, Xiao R. Huang, Han Y. Lan, Bao Lu, Joshua Farber, Andrew D. Luster, Vicki R. Kelley: CXCL9, but not CXCL10, promotes CXCR3-dependent immune-mediated kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008, 19: 1177-1189
 47. Xie JH, Nomura N, Lu M, Chen SL, Koch GE, Weng Y, Rosa R, Di Salvo J, Mudgett J, Peterson LB, Wicker LS, De Martino JA: Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. *J Leukoc Biol.* 2003, 73:771-780
 48. Han GD, Suzuki K, Koike H, Suzuki K, Yoneyama H, Narumi S, Shimizu F, Kawachi H: IFN-inducible protein-10 plays a pivotal role in maintaining slit-diaphragm function by regulating podocyte cell-cycle. *J Am Soc Nephrol.* 2006, 17: 442-453
 49. Huber TB, Reinhardt HC, Exner M, Burger JA, Kerjaschki D, Saleem MA, Pavenstädt H: Expression of functional CCR and CXCR chemokine receptors in podocytes. *J Immunol* 2002, 168: 6244-6252

50. Han GD, Koike H, Nakatsue T, Suzuki K, Yoneyama H, Narumi S, Kobayashi N, Mundel P, Shimizu F, Kawachi H: IFN-inducible protein-10 has a differential role in podocyte during Thy 1.1 glomerulonephritis J Am Soc Nephrol 2003, 14: 3111-3126
51. Paola Romagnani, Chiara Beltrame, Francesco Annunziato, Laura Lasagni, Michaela Luconi, Grazia Galli, Lorenzo Cosmi, Enrico Maggi, Maurizio Salvadori, Cinzia Pupilli, Mario Serio: Role of interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol 1999, 10: 2518-1526
52. Segerer Stephan, Bernhard Banas, Markus Wörnle, Holger Schmid, Clemens D. Cohen, Matthias Kretzler, Matthias Mack, Eva Kiss, Peter J. Nelson, Detlef Schlöndorff, Hermann-Josef Gröne: CXCR3 is involved in tubulointerstitial injury in human glomerulonephritis. American Journal of Pathology 2004, 164: 635-649
53. Kishi J, Nishioka Y, Kuwahara T, Kakiuchi S, Azuma M, Aono Y, Makino H, Kinoshita K, Kishi M, Batmunkh R, Uehara H, Izumi K, Sone S.: Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice. Eur respir J 2011, 38: 415-424
54. Chen et al.: United States Patent Application Publication, Pub. No.: US2011/0034487A1; 2011
55. Cambien, BF Karimjee, P Richard-Fiardo, H Bziouech, R Barthel, MA Millet, V Martini, D Birnbaum, JY Scoazec, J Abello, T Al Saati, MG Johnson, TJ Sullivan, JC Medina, TL Collins, A Schmid-Alliana and H Schmid-Antomarchi: Organ-specific inhibition of metastatic colon carcinoma by XCR3 antagonism. British Journal of Cancer 2009; 100: 1755-1764
56. de Wit GA et al. Economic evaluation of end stage renal disease treatment. Health Policy 1998, 44: 215-232
57. Robledo MM, Bartolome RA, Longo N, Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Longo I, van Muijen GN, Sanchez-Mateos P, Teixido J: Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. J Biol Chem; 2001, 276: 45098-45105
58. Goldberg-Bittman L, Neumark E, Sagi-Assif O, Azenshtein E, Meshel T, Witz IP, Ben-Baruch A: The expression of the chemokine receptor CXCR3 and its

ligand, CXCL10, in human breast adenocarcinoma cell lines. *Immunol Lett*; 2004, 92: 171-178

59. Engl T, Relja B, Blumberg C, Müller I, Ringel EM, Beecken WD, Jonas D, Blaheta RA. *Life Sci*; 2006, 78: 1784-1793
60. Goldberg-Bittman L, Sagi-Assif O, Meshel T, Nevo I, Levy-Nissenbaum O, Yron I, Witz IP, Ben-Baruch A: Cellular characteristics of neuroblastoma cells: regulation by the ELR—CXC chemokine CXCL10 and expression of a CXCR3-like receptor. *Cytokine* 2005, 29: 105-117

8.2 Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Volker Vielhauer für die Bereitstellung des Themas. Insbesondere möchte ich mich für sein Engagement und seine stete Unterstützung bedanken.

Frau Dr. Olga Ninichuk möchte ich für den Erfahrungsaustausch.

Bei den technischen MitarbeiterInnen des Instituts Frau Eva Radomska, Frau Stefanie Bertler und Herrn Nuru Eltrich möchte ich mich für die tatkräftige Hilfe und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Dan Draganovici danke ich für die Anfertigung und Färbung der histologischen Schnitte.

Allen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern an der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

Insbesondere gilt mein Dank auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich jederzeit unterstützt und motiviert haben.